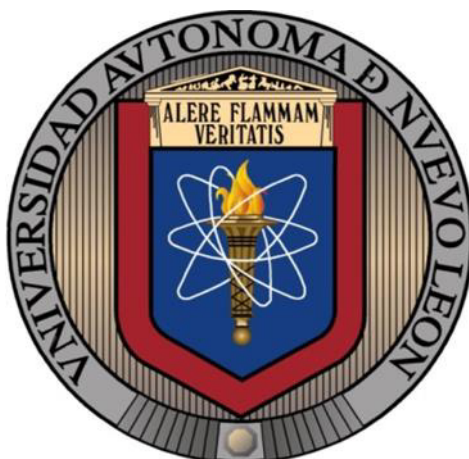


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DE *Saccharomyces sp.* RELACIONADO  
AL PROTEOMA DE LA MALTA**

**POR**

**MC. JESSICA GISELLE HERRERA GAMBOA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DE *Saccharomyces* sp. RELACIONADO  
AL PROTEOMA DE LA MALTA**

**POR**

**MC. JESSICA GISELLE HERRERA GAMBOA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2018**



Análisis genómico funcional de *Saccharomyces* sp. relacionado al proteoma de la malta

**Comité de Tesis**

Dr. Benito Pereyra Alférez  
Presidente

Dr. Jorge Hugo García García  
Secretario

Dr. Luis Jesús Galán Wong  
1 Vocal

Dra. Katuska Arévalo Niño  
2 Vocal

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
3 Vocal



Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez, en el Laboratorio de Microbiología OS de Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma bajo la dirección del Dr. Luis C. Damas Buenrostro y en la Unidad de Biología Molecular Genómica y Secuenciación de CIDICS de la UANL con el apoyo de la Dra. Roció Ortiz López.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto PEI 231412 y a la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado con número de becario 265329.

A Cervecería Cuautémoc-Moctezuma por todo el apoyo otorgado a lo largo del proyecto, especialmente al Dr. Luis Damas no solo por su apoyo como codirector del proyecto, sino por ser una de las personas de las que mas aprendí durante mi Doctorado. De igual manera a Esmeralda Pérez por el apoyo, interés y comentarios a lo largo de la realización de esta tesis. A todo el personal de Cervecería y estudiantes que de una u otra manera me ayudaron en todo momento.

Al CIDICS por abrirme sus puertas y dejarme experimentar y aprender. A la Dra. Roció Ortiz por tanto apoyo, consejo y confianza que dio al permitirme entrar en su laboratorio. A Ramsés Medina quien me ayudo con la secuenciación y se convirtió en uno de mis mejores amigos. A Ramiro Elizondo por su apoyo con la parte bioinformática.

A Claudia López, la mejor compañera de trabajo y una de mis mejores amigas, quien estuvo involucrada en gran parte de la realización de esta tesis.

A Leticia Barraza y Odeth Enríquez por ser mis mejores amigas y apoyarme siempre.

A todos mis compañeros del L4 que me apoyaron con todo lo que necesitaba, tanto en el laboratorio como fuera de el.

Finalmente, agradezco a la persona mas importante en mi formación, el Dr. Benito Pereyra que siempre ha estado para apoyarme y guiarme con invaluable consejos, agradezco por su gran paciencia durante todos estos años y la confianza que siempre ha tenido en mi capacidad científica.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y a mi hermano por darme todo el apoyo, confianza y cariño para alcanzar todas mis metas, sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A Franco por ser siempre mi apoyo y motivación de todos los días. Te amo.

## ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
<i>Objetivo general</i>	8
<i>Objetivos particulares</i>	8
DESCRIPCIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	9
CAPITULO I. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE CEBADA MALTEADA	10
RESUMEN	10
I.1 INTRODUCCIÓN	10
I.2 MATERIALES Y MÉTODOS	12
<i>I.2.1 Muestras biológicas</i>	12
<i>I.2.2 Extracción de proteína</i>	12
<i>I.2.3 Análisis proteómico de las maltas</i>	13
<i>I.2.4 Actividad proteolítica global y ensayos de inhibición</i>	14
<i>I.2.5 Zimogramas de actividad enzimática</i>	14
I.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
<i>I.3.1 Comparación del perfil proteómico de maltas</i>	15
<i>I.3.2 Proteínas identificadas en malta y su relación con la calidad de la malta</i>	20
<i>I.3.3 Actividad proteolítica</i>	24
I.4 CONCLUSIONES	29
CAPITULO II. FERMENTACIONES Y CALIDAD DE LA CERVEZA	30
RESUMEN	30
II. 1 INTRODUCCIÓN	30
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS	31
<i>II.2.1 Cepas de levadura</i>	31
<i>II.2.2 Preparación de los mostos</i>	32
<i>II.2.3 Perfil de aminoácidos</i>	32
<i>II.2.4 Fermentaciones</i>	32
<i>II.2.5 Evaluación de parámetros de fermentación</i>	33
II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
<i>II.3.1 Formulaciones de mostos y variación en perfil de aminoácidos</i>	34
<i>II.3.2 Control microbiológico, viabilidad y células en suspensión</i>	35

II.3.3 Concentración de aminoácidos y nitrógeno libre asimilable	36
II.3.4 Producción de compuestos volátiles	38
II.4 CONCLUSIONES	40
<b>CAPITULO III. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA LEVADURA</b>	<b>41</b>
RESUMEN	41
III.1 INTRODUCCIÓN	41
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	42
III.2.1 Extracción de ARN total	42
III.2.2 Purificación de ARN	42
III.2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN	43
III.2.4 Preparación de la librería para determinar la secuencia nucleotídica del ARN	43
III.2.5 Validación de la librería para secuenciación	43
III.2.6 Secuenciación nucleotídica	44
III.2.7 Análisis de resultados	44
III.3 RESULTADOS	46
III.3.1 Extracción de ARN	46
III.3.2 Secuenciación del transcriptoma	47
III.3.3 Calidad y lecturas obtenidas de la secuenciación	49
III.3.4 Alineamiento con genoma de referencia <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
III.3.5 Ensamblaje de novo y anotación de genes	52
III.3.6 Análisis de genes diferencialmente expresados	53
III.3.6 Asociación de genes diferencialmente expresados con la generación de compuestos volátiles de azufre y esteres	67
III.3.7 Análisis de la función de genes diferencialmente expresados y su relación con la generación de compuestos volátiles de azufre y esteres	77
<b>III.4 CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>IV. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>91</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>93</b>
<b>APENDICE A.</b>	<b>101</b>
<b>NOMBRE DE LAS SECUENCIAS DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS PARA CADA CEPA Y SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.</b>	<b>101</b>
<b>APENDICE B.</b>	<b>103</b>
<b>NIVELES DE EXPRESION DE TRANSCRITOS CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.</b>	<b>103</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de señales detectadas con 2D-PAGE	17
<b>Tabla 2.</b> Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF	19
<b>Tabla 3.</b> Formulación de los mostos y cepa utilizada	35
<b>Tabla 4.</b> Niveles de FAN en mostos	37
<b>Tabla 5.</b> Concentración relativa de aminoácidos	37
<b>Tabla 6.</b> Parámetros monitoreados en la Fermentación	39
<b>Tabla 7.</b> Concentración de RNA total	47
<b>Tabla 8.</b> Índices utilizados en las librerías de RNA	47
<b>Tabla 9.</b> Concentración de las librerías para secuenciación de transcriptoma	48
<b>Tabla 10.</b> Distribución de las lecturas obtenidas por secuenciación	49
<b>Tabla 11.</b> Reporte del Alineamiento contra la referencia <i>S. cerevisiae</i> S288C	50
<b>Tabla 12.</b> Ensamblaje de novo de secuenciación de transcriptomas	52
<b>Tabla 13.</b> Anotación de transcritos diferencialmente expresados significativamente para la cepa 790	58
<b>Tabla 14.</b> Anotación de transcritos diferencialmente expresados para la cepa 820	61
<b>Tabla 15.</b> Enzimas identificadas con expresión diferencial $p=0.05$ cepa 790	65
<b>Tabla 16.</b> Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial $p=0.05$ cepa 820	67
<b>Tabla 17.</b> Genes involucrados en la generación de compuestos aromáticos	68
<b>Tabla 18.</b> Asociación de DEGs con genes involucrados en generación de compuestos de azufre	72
<b>Tabla 19.</b> Asociación de DEGs con genes involucrados en generación de compuestos volátiles	76
<b>Tabla 20.</b> Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 790 con una significancia de $p=0.05$	101
<b>Tabla 21.</b> Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 820 con una significancia de $p=0.001$	102
<b>Tabla 22.</b> Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 820 con una significancia de $p=0.05$	102
<b>Tabla 23.</b> Niveles de expresión de DGEs. Cepa 790 $p=0.05$	103
<b>Tabla 24.</b> Niveles de expresión de DGEs. Cepa 820 $p=0.05$	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Perfil proteómico de muestras de malta. 1 y 2 representan duplicados para la malta M1; 3 y 4 los duplicados para la malta M2.	16
<b>Figura 2.</b> Actividad general proteolítica. UAE: Unidades enzimáticas aleatorias.	25
<b>Figura 3.</b> Perfil proteolítico de maltas M1 y M2 del 2011	26
<b>Figura 4.</b> Perfil de amilasas de maltas M1 y M2 del 2011	28
<b>Figura 5.</b> Células en suspensión durante el transcurso de las fermentaciones	36
<b>Figura 6.</b> Electroferograma representativo de la integridad del RNA.	47
<b>Figura 7.</b> Electroferogramas de las librerías para secuenciación.	48
<b>Figura 8.</b> Tamaño de los insertos en pb de cDNA secuenciados	49
<b>Figura 9.</b> Alineamiento del transcriptoma contra la referencia <i>S. cerevisiae</i> S288C. Porcentaje de bases alineadas a secuencias codificantes se representan en amarillo	51
<b>Figura 10.</b> Genes diferencialmente expresados en la cepa 790 ( $p=0.05$ y $p=0.001$ ). En verde se presentan los genes con mayor expresión	54
<b>Figura 11.</b> Genes diferencialmente expresados en la cepa 820 ( $p=0.05$ y $p=0.001$ ). En verde se presentan los genes con mayor expresión	55
<b>Figura 12.</b> Número de transcritos diferencialmente expresados por cepa y nivel de significancia	56
<b>Figura 13.</b> Distribución de homología de secuencias analizadas para las cepas 790 y 820	57
<b>Figura 14.</b> Distribución de la clasificación de DEG por GO. En rojo se muestran resultados de la cepa 790, en azul los de la cepa 820 y en gris los correspondientes a la referencia.	63
<b>Figura 15.</b> Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial $p=0.05$ cepa 790	64
<b>Figura 16.</b> Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial $p=0.05$ cepa 820	66
<b>Figura 17.</b> Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de compuestos de azufre. Cepa 790	69
<b>Figura 18.</b> Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de compuestos de azufre. Cepa 820	70
<b>Figura 19.</b> Numero de interacciones entre DGEs y genes en las rutas de generación de compuestos de azufre	71
<b>Figura 20.</b> Niveles de expresión de DGEs respecto a variedad de malta asociados a rutas de generación de compuestos de azufre. Malta A y B corresponde a M1 y M2.	72
<b>Figura 21.</b> Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de esteres. Cepa 790	74
<b>Figura 22.</b> Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de ésteres. Cepa 820	75
<b>Figura 23.</b> Numero de interacciones entre DGEs y genes en las rutas de generación de ésteres	76
<b>Figura 24.</b> Niveles de expresión de DGEs respecto a variedad de malta asociados a rutas de generación de ésteres. Malta A y B corresponde a M1 y M2.	77
<b>Figura 25.</b> Formación de compuestos de azufre. Cepa 790 (Modificado de Leal, 2011)	80
<b>Figura 26.</b> Formación de compuestos de azufre. Cepa 820 (Modificado de Leal, 2011)	84
<b>Figura 27.</b> Formación de ésteres. Cepa 790	86
<b>Figura 28.</b> Formación de esteres. Cepa 820	89

## INTRODUCCIÓN

La cerveza es el resultado de la fermentación del mosto por la levadura. El mosto es el líquido acuoso donde se combinan agua, cebada malteada y otros aditivos. El principal producto de la fermentación es el etanol, sin embargo, junto a este, se generan una gran cantidad de subproductos que determinan las características de la cerveza.

El malteado es un proceso fundamental previo a la producción de cerveza, consiste en la germinación de los granos de cebada para producir un grano macerable el cual se conoce con el nombre de malta. Durante esta etapa se desarrolla una mezcla compleja de sustratos, proteínas y las enzimas necesarias para su transformación. Las enzimas son producidas durante la etapa de germinación e impactan de manera muy significativa las propiedades de la cerveza, en especial las propiedades organolépticas.

La fermentación alcohólica es el proceso en el cual los azúcares como sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa, presentes en el mosto son convertidos por la levadura en etanol y dióxido de carbono, además en esta etapa son producidos diversos compuestos que constituyen el sabor y perfil aromático característico de las bebidas alcohólicas. Por el metabolismo propio de la levadura, estos compuestos son excretados al medio al ser consumidos los distintos componentes del mosto (Meilgaard. 1999).

Dentro de este grupo de compuestos producidos durante la fermentación, se encuentran alcoholes, ésteres (Mountounet. 1969; Rapp y Mandery. 1986), compuestos sulfurados, acetaldehídos (Rusell. 1995) y dicetonas vicinales (Munroe. 1995).

La formación de estos compuestos es altamente dependiente del tipo de malta utilizada, la cepa de levadura y su respuesta metabólica y finalmente, los parámetros de fermentación (tiempo, concentración de oxígeno disuelto, temperatura, etc.) (Sablayrolles y Ball. 1995; Pfisterer y Stewart. 1975; Younis y Stewart. 1998; Anderson y Kirsop. 1975; Thurston *et al.*, 1981; 1982).

La levadura se enfrenta a un cúmulo de compuestos presentes en el mosto, los cuales varían dependiendo no solo del tipo de grano malteado, sino también de la época del año, condiciones atmosféricas durante el crecimiento, tipo de suelo, localización geográfica, etc. Por tanto, la respuesta a tales variables podría tener un efecto importante

en la levadura para la síntesis de compuestos e impactar positiva o negativamente al producto final.,

Por tal motivo, es fundamental obtener el conocimiento de los mecanismos de regulación genética y bioquímica de las rutas metabólicas implicadas no solo en la biosíntesis del etanol y compuestos volátiles, sino también del metabolismo central y transporte.

Con el conocimiento y análisis comparativo del proteoma de variedades de malta y el análisis de la expresión genética de la levadura, se podrá establecer de qué forma interactúa la materia prima con la levadura durante el proceso cervecero. Mediante este estudio se podrán identificar marcadores de calidad y desarrollar técnicas moleculares que permitan diseñar procesos y obtener cervezas con las características deseadas y la mayor calidad.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las características bioquímicas de la malta junto con las características genéticas de la levadura definirán las características y la calidad de la cerveza. Debido a que aún no se tiene un total conocimiento y control sobre las características presentes en la malta, es necesaria una caracterización adecuada de la materia prima y estudiar su influencia sobre el tipo de cepa de levadura utilizada en el proceso. Con este estudio se pretende optimizar y controlar las características de la cerveza como producto final.,

## **HIPÓTESIS**

Mediante el estudio del proteoma de la malta y su impacto en la regulación de la expresión genética de la levadura, es posible predecir la calidad de la cerveza. Adicionalmente, podremos identificar proteínas y genes que sirvan como marcadores de calidad importantes para el proceso cervecero.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar el proteoma de cebadas malteadas utilizadas en el proceso cervecero y evaluar su posible impacto en el transcriptoma de la levadura de proceso.

### **Objetivos particulares**

1. Conocer el proteoma de dos variedades de cebada malteada
2. Analizar las diferencias en actividad enzimática de dos variedades de cebada malteada
3. Identificar marcadores bioquímicos de la malta relacionados con la calidad de la cerveza.
4. Realizar el análisis transcripcional global dos cepas de levadura durante la fermentación de mostos con diferentes tipos de malta.

5. Analizar la secuencia del transcriptoma e identificar genes expresados diferencialmente
6. Estudiar la relación entre proteínas y aminoácidos de la materia prima con la expresión de genes involucrados en la producción compuestos volátiles en la levadura.

## **DESCRIPCIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

### **Capítulo I.** Análisis proteómico de cebada malteada.

Este capítulo describe las dos variedades de malta utilizadas en este estudio: Malta M1 y Malta M2. Presentamos los resultados de los análisis proteómicos e hidrolíticos de cada malta y la identificación de proteínas y enzimas que pueden ser candidatos a biomarcadores de calidad.

### **Capítulo II.** Fermentaciones y calidad de la cerveza.

Las dos variedades de malta fueron utilizadas para preparar cuatro formulaciones distintas de mostos, los cuales fueron fermentados con dos cepas de levadura cervecera. Los resultados de la comparación de mostos y las cervezas son presentados en este capítulo.

### **Capítulo III.** Análisis transcripcional de la levadura.

Este capítulo describe los resultados de la secuenciación del RNA de las levaduras utilizadas en el capítulo anterior. Este capítulo integra los resultados obtenidos en el Capítulo 2 con los resultados del análisis transcripcional.,

# CAPITULO I. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE CEBADA MALTEADA

## RESUMEN

En este capítulo se describen los resultados de la comparación proteómica de dos variedades de malta, M1 y M2, para diferentes cosechas del año 2009, 2010, 2011 y 2012. Utilizamos geles de poliacrilamida bidimensionales para estudiar el proteoma de las maltas e identificar señales proteicas con diferencias significativas que pudieran ser utilizadas como marcadores de calidad. La identidad de las señales fue obtenida mediante la técnica de MALDI-TOF/TOF. Con estos análisis fueron detectadas varias proteínas que se relacionan con el desempeño de la fermentación y con la calidad de la cerveza. Debido a su importancia en el proceso cervecero, se estudió la actividad proteolítica general y mediante zimogramas, estudiamos los perfiles proteolíticos y amilolíticos.

## I.1 INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cereales más cultivados a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar en importancia (Guo *et al.*, 2016) y es ampliamente utilizado para las industrias de alimentos y bebidas (Matthies *et al.*, 2014). En México son sembradas cinco diferentes variedades de cebada que cumplen los requerimientos de calidad para la industria cervecera: Armida, Adabella, Alina, Esmeralda y Esperanza (Peñala. 2011). Estas variedades son cultivadas en 2 ciclos: primavera-verano (riego de temporal) y otoño-invierno (riego artificial) (Peñala. 2011).

El malteado es el proceso, en el cual el grano de cebada se somete a condiciones de humedad para activar el proceso de germinación y secado, es durante este proceso cuando se activan las enzimas necesarias para transformar las reservas del grano (almidón y proteínas) en los componentes necesarios para el proceso de fermentación (Laštovičková y Bobálová. 2012).

La calidad de la malta y la cerveza final se definen por las características de los granos de cebada y de los parámetros de malteado (Laštovičková y Bobálová. 2012). El contenido de proteínas, enzimas, viabilidad de la germinación, contenido de hidratos de carbono, entre otros, será determinado principalmente por las características del grano, sin embargo, son afectadas por las condiciones de malteo. Cada variedad de cebada malteada genera características organolépticas únicas, lo cual es explotado para producir diferentes tipos de cervezas; entender las características bioquímicas de la malta para predecir las características de la cerveza final es uno de los mayores objetivos en la industria cervecera.

Un gran número de estudios han sido dirigidos hacia las proteínas metabólicas presentes en la malta que influyen en su calidad. Las especies de plantas incluyen *Arabidopsis thaliana*, que se utiliza como modelo de estudio, la cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*) y el arroz (*Oryza sativa*) (Li *et al.*, 2014). La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es el método más popular para analizar proteomas y en combinación con procedimientos de identificación de espectrometría de masas y estudios de actividad enzimática mediante zimografía, es posible hacer comparaciones entre diferentes maltas y encontrar las proteínas que puedan ser utilizadas como marcadores de calidad.

Existen pocos estudios que relacionen el proteoma de las maltas con su calidad para el uso en la producción de cerveza, solo algunos estudios como el reportado por (Jin *et al.*, 2013a) han llegado a relacionar las proteínas metabólicas separadas en un intervalo de pH de 4.0-7.0 con las características de dos tipos de malta con diferente nivel de calidad para la industria cervecera. Otros ejemplos de análisis comparativo a través de técnicas proteómicas es el reportado por (Guo *et al.*, 2016) donde comparan los proteomas de dos variedades de cebada utilizadas para la industria cervecera y de alimento dirigido al contenido de proteína en cada una de las variedades y el estudio de (Jin *et al.*, 2013b) en el cual comparan dos maltas con diferente grado de filtrabilidad.

Diversos estudios sobre el sistema hidrolítico de las maltas se han llevado a cabo utilizando separaciones electroforéticas con sustratos copolimerizados mejor conocidos como zimogramas (Vandooren *et al.*, 2013), así se ha encontrado que diferentes variedades de malta pueden contener diferentes perfiles de bandas con tipos de actividad



proteolítica a diferentes pH (Fontanini y Jones. 2001; Zhang y Jones. 1995; Wrobel y Jones. 1992)

Debido a la importancia del estudio de las variaciones en el proteoma y su relación con la calidad de la malta y finalmente de la cerveza, fueron estudiados las diferencias en el perfil proteómico de dos variedades de cebada malteada con el objetivo de obtener información a nivel proteómico de las diferencias entre dos variedades de malta y relacionar las proteínas encontradas en las maltas con parámetros de calidad.

## **I.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I.2.1 Muestras biológicas**

Muestras de dos diferentes variedades de cebada malteada, provenientes de cosechas de los años 2009, 2010, 2011 y 2012, fueron proporcionadas por Cervecería Cuahutemoc-Moctezuman de México. Las maltas fueron nombradas como M1 y M2, y almacenadas a -20° C hasta su uso.

### **I.2.2 Extracción de proteína**

Las muestras de malta fueron molidas hasta obtener un polvo fino ( $< 50 \mu\text{m}$ ). El polvo (0.52 g) fue homogenizado en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0 mediante vortex por 30 min, alternando en hielo, centrifugadas a 10,000 rpm, 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recuperados y dializados contra buffer de acetatos de sodio 5 mM por 24 h a 4 °C (Wrobel y Jones. 1992). La concentración de proteína soluble fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford. 1976).

### **I.2.3 Análisis proteómico de las maltas**

#### ***A) Electroforesis bidimensional (2d-page)***

Previo a la separación en 2D, muestras de 150 µg de proteína de cada malta, fueron limpiadas con el estuche 2D Clean-Up kit (GE Healthcare). La mezcla de proteínas fue resuspendida en 125 µl de DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare) con 0.5 % del buffer IPG (GE Healthcare). Las muestras fueron pasivamente absorbidas durante la etapa de rehidratación por 17 h en tiras ReadyStrip™ IPG 7 cm pH 3.0-10.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El isoelectroenfoque se realizó utilizando un equipo Protean IEF Cell System (Bio Rad) para un total de 14 kVh (250 V por 20 min, 4000 V por 2 h y 4000 V hasta 10000 Vh). Después de eso, las tiras fueron equilibradas consecutivamente en dos buffers de equilibrio (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 20 % glicerol, 2 % SDS), suplementado con DTT (2 %) y después iodoacetamida (2.5 %). Las tiras equilibradas fueron corridas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % en presencia de buffer (0.25 M Tris Base, 2 M glicina y 1 % SDS) a 10 mA/gel durante 30 min y 20 mA/gel durante 1.5 h. Los geles fueron teñidos con tinción de Azul Brillante de Coomassie R-250 (0.1 % Azul Coomassie R-250, 8 % ácido acético, 40 % metanol, 52 % agua). Las separaciones fueron realizadas por duplicado para cada muestra.

#### ***B) Análisis bioinformático***

Los geles 2D-PAGE fueron digitalizados mediante un densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y analizados utilizando el software PDQuest Advanced 8.0.1 (Bio-Rad). La detección de los spots, sustracción de fondo, creación del gel maestro y el empalme de las imágenes se realizó automáticamente durante el análisis. Fueron determinados los spots expresados diferencialmente y aquellos que tuvieran un *p-value* menor a 0.05 (Prueba t Student) fueron considerados significativos. Spots con alta calidad (mayor a 50 según la evaluación del software) fueron cortados del gel con ayuda del EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad). Todos los geles se realizaron por triplicado independientes.

### ***C) Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF***

La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas fue realizada por la empresa Applied Biomics (Hayward, CA, USA). Los spots fueron sujetos a una digestión con tripsina en gel, extracción de péptidos y desalado, seguido de un análisis por MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) para determinar la identidad de la proteína mediante la búsqueda en las bases de datos con el software GPS Explorer equipado con el motor de búsqueda Mascot.

### **I.2.4 Actividad proteolítica global y ensayos de inhibición**

La actividad proteolítica general fue evaluada mediante la hidrólisis de azocaseína siguiendo el protocolo descrito por (Secades y Guijarro. 1999). 180 µg de proteína total fueron diluidas con agua mQ a un volumen final de 120 µl, y se mezclaron con 480 µl de una solución de azocaseína 1% (p/v) en 25 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub> at pH 7.5. La mezcla fue incubada a 30°C por 30 min y fue detenida al agregarle 600 µl of ácido tricloroacético al 10% (p/v) e incubada durante 30 min en hielo. La reacción fue centrifugada por 10 min a 15000 g y 4 °C. En seguida, 800 µl del sobrenadante fue neutralizado con 200 µl of 1.8 N NaOH. La absorbancia fue medida a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad que produce un incremento en la absorbancia a 420 nm de 0.01 en 30 min a 30°C.

### **I.2.5 Zimogramas de actividad enzimática**

Estos ensayos fueron realizados solo para las maltas de la cosecha 2011 debido a que solo esta cosecha se iba a trabajar en el presente proyecto.

#### ***A) Actividad proteolítica***

La actividad proteolítica fue evaluada por zimogramas en geles de poliacrilamida de una dimensión, en los cuales, 50 µg de proteína total fue mezclada con un volumen

de buffer de muestra (125 mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 24 % [v/v], 0.02 % [w/v] azul de bromofenol) y separadas en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones nativas con 0.2 % [w/v] gelatina-copolimerizada. Los geles fueron corridos a 20 mA/gel a 4 °C. Después de la separación, el gel fue lavado con agua bidestilada e incubado overnight a 40° C en 25 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a pH 5.0, 7.0, 9.0 para el caso de actividad proteasa. Después, los geles fueron lavados con agua bidestilada y teñidos con tinción de Azul Brillante de Coomassie R-250 en el caso de actividad proteasa. La actividad se observa por la hidrólisis del sustrato dando como resultado bandas claras sobre el fondo teñido del gel. Todos los geles se realizaron por triplicados independientes.

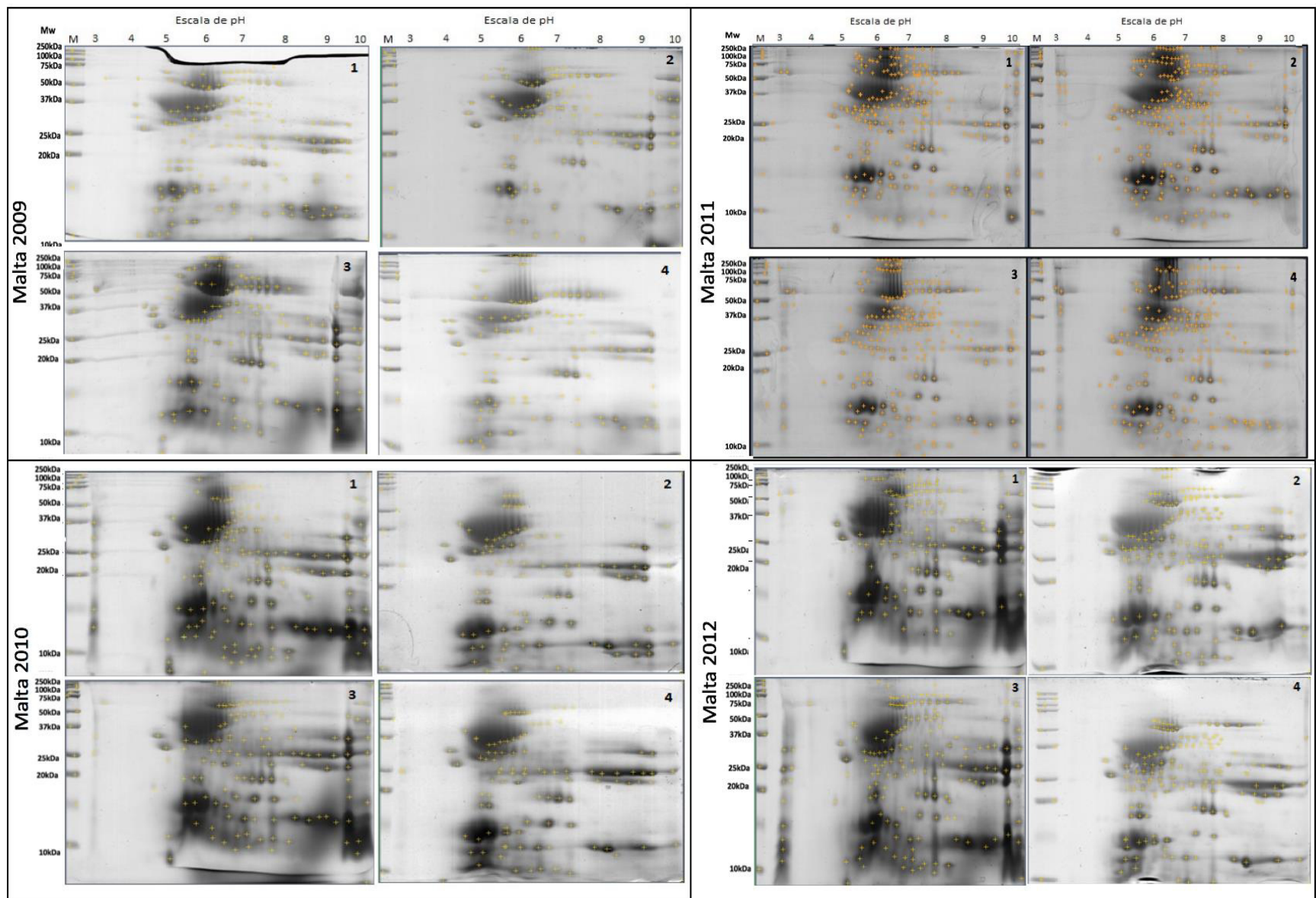
### ***B) Actividad amilolítica***

La actividad amilolítica fue evaluada por zimogramas en geles de poliacrilamida de una dimensión de manera similar a lo descrito para actividad proteolítica, solo que para este caso se utilizaron condiciones desnaturalizantes no reductoras. 50 µg de proteína total fue mezclada con un volumen de buffer de muestra más 1 % SDS y separadas en geles de poliacrilamida al 12 % con 0.2% [w/v] almidón de papa-copolimerizado. Después de la separación, el gel fue lavado con agua bidestilada e incubado overnight a 40° C en buffer de acetato de sodio 0.05 M pH 5.0 y 6.0. Después, los geles fueron lavados con agua bidestilada y teñidos con solución de lugol. Todos los geles se realizaron por triplicados independientes.

## **I.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **I.3.1 Comparación del perfil proteómico de maltas**

El perfil proteómico de dos variedades de malta correspondientes a las cosechas de los años 2009, 2010, 2011 y 2012 fueron obtenidos y comparados mediante electroforesis bidimensional. Los geles fueron documentados y analizados de manera bioinformática. En la figura 1 se muestran los geles correspondientes a muestras de malta M1 y malta M2.



**Figura 1.** Perfil proteómico de muestras de malta. 1 y 2 representan duplicados para la malta M1; 3 y 4 los duplicados para la malta M2.

Similar número de spots fueron detectados entre las dos variedades de malta. Para las muestras del año 2011 se detectó un mayor número de spots aun siendo utilizada la misma concentración de proteína en cada gel (Tabla 1). Este efecto se puede explicar debido a que la malta 2011 fue procesada inmediatamente después de ser entregada mientras que las maltas 2009, 2010 y 2012 estuvieron almacenadas por un tiempo a temperatura ambiente y después fueron almacenadas a -20°C.

**Tabla 1.** Número de señales detectadas con 2D-PAGE

Cosecha	Señales detectadas		Señales significativas*	
	M1	M2	Cuantitativas	Cualitativas
2009	136±18	125±17	71	39
2010	133±45	123±22		
2011	246±10	229±10		
2012	153±17	161±28		

\*p-value ≤0.05 (Prueba t Student)

Los análisis bioinformáticos y estadísticos se realizaron entre variedades de malta y no entre año de cosecha para descartar los efectos del almacenamiento, además solo se tomaron en cuenta spots que estuvieran presentes en ambos duplicados de cada malta. Las diferencias cuantitativas representan cambios (de al menos 2 veces) en la concentración del spot entre maltas y las diferencias cualitativas son aquellas señales que están presentes en solo una de las variedades.

De los spots que presentaron señales cuantitativas y cualitativas y que además tuvieran un valor de *p-value* ≤0.05 (según la prueba t Student), fueron escogidos aquellos en los que el spot tuviera un valor de calidad (calculado por el software) de al menos 50% y que visualmente fuera un spot bien definido. Estos spots fueron cortados y su identidad fue obtenida mediante la técnica de MALDI-TOF/TOF. Un total de 18 spots fueron exitosamente identificados, en la tabla 2 se presenta la identidad de los spots.

Las proteínas identificadas fueron divididas en 4 grupos principales de acuerdo a su función en la cebada:

1. Proteínas hidrolíticas (4), aquellas que participan en el metabolismo de proteínas de reserva o carbohidratos.
2. Proteínas de tolerancia a factores de estrés (2), son las proteínas que son expresadas como respuesta a factores de estrés ambiental (frio, sequia, etc.).
3. Proteínas de defensa (7), participan en la defensa de la planta ante el ataque exógeno para prevenir daños eventuales,
4. Proteínas de reserva (1), son metabolizadas por las proteínas hidrolíticas para obtener los recursos necesarios para el proceso de germinación del grano.
5. Proteínas hipotéticas (4), aquellas que han sido encontradas y por homología con otras secuencias de la base de datos se les da una función hipotética.

**Tabla 2.** Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF

ID Spot	Año	Malta	Peso molecular Teo./Obs.	pI	Identidad	No. Acceso
<b>Enzimas Hidrolíticas</b>						
5711 a	2011	M1	62.8/59.6	6.40	Beta-amilasa; 1,4-alfa-D-glucan maltohidrolasa; Beta-Am1; FLAG precursor	gi 75107132
7703 b	2011	M2	58.7/57.4	7.70	Beta-glucosidasa A [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 193073259
6502 a	2011	M2	38.4/33.2	6.90	Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2, citosólica	gi 120668
6508 a	2011	M2	38.7/33.2	7.30	Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2, citosólica	gi 120668
<b>Tolerancia al estrés</b>						
6401 b	2011	M2	25.4/25.0	7.00	Glutation S-transferasa [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 6683765
5307 a	2011	M1	17.7/18.9	6.60	18.9 kDa ABA-proteína inducida [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 1052747
<b>Proteínas de defensa</b>						
5816 a	2012	M1	22.2/96.6	7.78	Inhibidor de Alfa-amilasa/subtilisina OS= <i>Hordeum vulgare</i> PE=1 SV=2	IAAS_HORVU
5507 a	2011	M1	32.1/26.2	7.10	Cadena A, estructura cristalina de la familia de las quitinasas Gh-19 en semillas de centeno	gi 400977413
7402 a	2011	M2	25.5/25.9	8.00	Cadena A, estructura cristalina de una endoquitinasa de semillas de <i>Hordeum vulgare</i> L	gi 157834680
6502 b	2011	M1	33.4/37.4	8.54	26 kDa endoquitinasa 1 OS= <i>Hordeum vulgare</i> PE=2 SV=4	CHI1_HORVU
6303 a	2010	M1	16.1/14.7	7.49	Inhibidor de tripsina CMe OS= <i>Hordeum vulgare</i> GN=ITR1 PE=1 SV=3	IAAE_HORVU
5601 b	2010	M1	43.2/31.8	5.72	Serpina-Z4 OS= <i>Hordeum vulgare</i> GN=PAZ1 PE=1 SV=2	SPZ4_HORVU
7502 b	2012	M2	33.4/31.5	8.54	26 kDa endoquitinasa 1 OS= <i>Hordeum vulgare</i> PE=2 SV=4	CHI1_HORVU
<b>Proteínas de reserva</b>						
7404 b	2009	M2	34.7/32.9	8.34	Gamma-hordeína-1 OS= <i>Hordeum vulgare</i> PE=2 SV=1	HOG1_HORVU
<b>Proteínas predichas/hipotéticas</b>						
8610 a	2011	M1	43.7/38.8	9.40	Proteína predicha [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 326516774
6301 a	2011	M2	23.0/24.2	7.00	Proteína hipotética [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 2266666
6604 a	2011	M2	43.9/42.2	7.30	Proteína predicha [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 326523037
2303 b	2011	M2	18.5/18.9	5.50	Proteína predicha [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	gi 326515048

<sup>a</sup> spots con diferencias cualitativas y <sup>b</sup> spots con diferencias cuantitativas



### **I.3.2 Proteínas identificadas en malta y su relación con la calidad de la malta**

#### ***A) Enzimas hidrolíticas***

La conversión de almidones a azúcares durante malteado se cataliza principalmente por enzimas hidrolíticas (Li *et al.*, 2014). Estas enzimas incluyen dextrinasas, amilasas y glucosidasas (Schmitt *et al.*, 2013; Sun y Henson. 1990; Erkkilä *et al.*, 1998). La acción combinada de estas enzimas se conoce como "poder diastático" y tiene una gran influencia en la eficiencia de la fermentación y la calidad de la cerveza (Hu *et al.*, 2014). Entre estas enzimas, se identificó una beta-amilasa (**Spot 5711**) presente solo en la malta M1 del año 2011 y una beta-glucosidasa (**Spot 7703**) expresada mayormente en malta M2 del año 2011. La sobreexpresión de esta enzima puede ser relacionada a incrementos en el poder diastático y ser considerado como un marcador de calidad (Herrera-Gamboa *et al.*, 2018).

#### ***B) Tolerancia al estrés***

Las glutatión-S-transferasas (**Spot 6041**) son enzimas multifuncionales que desempeñan un papel importante durante la desintoxicación de herbicidas y respuestas de tolerancia al estrés, además, implican aproximadamente el 2% de las proteínas solubles presentes en el grano (Rezaei *et al.*, 2013). Esta enzima se detectó en mayores cantidades en M2 del año 2011 ya que este cultivo al ser de tipo temporal (dato proporcionado por CCM), fue sometido a las condiciones ambientales en mayor medida.

Otra proteína identificada relacionada con la tolerancia al estrés ambiental fue la proteína inducida por ABA (**Spot 5307**); estudios han demostrado que esta proteína se induce en respuesta a los factores de estrés ambiental y las concentraciones de ácido abscísico. Se ha observado una mayor expresión del gen en plantas expuestas a temperaturas frías, y su presencia genera resistencia al frío en las plantas (Kurkela y Franck. 1990). Una importante función indeseable

de esta proteína es la supresión de genes de alfa-amilasa y proteasas durante el desarrollo de la semilla (Gomez-Cadenas *et al.*, 1999).

### ***C) Proteínas de defensa***

Dentro de esta categoría se encuentran proteínas que se han relacionado principalmente con las características “visuales” de la cerveza, como por ejemplo su turbidez o estabilidad de la espuma.

La formación de turbidez en la cerveza es un parámetro de mala calidad debido principalmente a que provoca su rechazo por parte del consumidor. Por lo general, en la mayoría de los tipos de cerveza se buscan altos niveles de claridad, con excepción de algunos tipos de cerveza donde no es un problema, como en el caso de los estilos Porter y Stouts. Durante la generación de turbidez están implicadas proteínas, polifenoles y carbohidratos.

El **Spot 5816** fue encontrado solo en malta M1 del año 2012 identificado como Inhibidor de alfa-amilasa/subtilisin también conocido como BASI. Este inhibidor actúa específicamente para regular la actividad de alfa-amilasa en la síntesis de gránulos de almidón durante el desarrollo del grano (Jarrett *et al.*, 1997) además actúa como proteína de defensa al inhibir serinproteasas provenientes de patógenos (Micheelsen *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2004). La presencia de esta proteína durante el proceso cervecero puede influenciar la velocidad de degradación del almidón (Munck *et al.*, 1985), influyendo en la solubilización de proteínas (Índice de Kolbach) y del extracto fermentable (Potokina *et al.*, 2006). Sin embargo, pierde su actividad durante el proceso de maceración del mosto (Jarrett *et al.*, 1997).

El **Spot 6303** fue identificado como Inhibidor de tripsina soluble en cloroformo/metanol (CMe) y se encontró solo en la malta M1 del año 2010. Esta proteína pertenece a la familia de inhibidores de tripsina y alfa-amilasa. Involucrada en procesos de defensa contra patógenos al inhibir tripsinas, alfa-amilasa y otras serinproteasas exógenas (Ye *et al.*, 2014). Estudios en muestras de cerveza han relacionado la presencia de este inhibidor con la generación de turbidez (Ye *et al.*, 2016; Limure y Sato. 2013; Jin *et al.*, 2009), también relaciona

esta proteína junto con las hordeínas y proteína Z como marcadores para la estabilidad de la espuma, turbidez y efervescencia.

El **spot 5601** fue identificado como una Serpina-Z4. Esta proteína presentó mayor expresión en malta M1 del año 2010, sin embargo, se sabe que el área de 30-50 kDa y pI entre 5 y 6 con intensa carga en geles de 2D-PAGE, pertenece las serpinas debido a la gran cantidad que se puede encontrar. Las serpinas son una de proteínas más abundantes en la cerveza, pertenecen a la familia de inhibidores de serinproteasas con una alta cantidad de lisina y su síntesis es regulada por la cantidad de nitrógeno disponible durante el desarrollo de la semilla (Steiner *et al.*, 2011). Se conocen tres tipos (Zx, Z4 y Z7), de las cuales la Serpina Z4 representa el 80% del total de proteínas encontradas (Specker *et al.*, 2014). En la cerveza, la proteína Z4 tiene los valores más altos de viscosidad y elasticidad (Steiner *et al.*, 2011) y se ha encontrado que favorece la estabilidad de la espuma en su estado glicosilado o a la presencia de turbidez (Perrocheau *et al.*, 2005).

Las hordeínas son las proteínas más abundantes en el grano de cebada, constituyen cerca del 40-50% del total y pertenecen al grupo de las prolaminas debido a su alto grado de prolina y ácido glutámico. Son clasificadas en tres grupos: 1) Hordeínas B y  $\gamma$  (gamma), las cuales son ricas en azufre y cisteína, 2) Hordeínas C, pobres en azufre y 3) Hordeínas D, con alto peso molecular (Salgado-Albarrán *et al.*, 2015). La Gamma ( $\gamma$ )-hordeínas identificada en el **spot 7404**, son hordeínas que prevalecen a lo largo del proceso cervecero e incluso pueden detectarse en la cerveza, se sabe que son los principales iniciadores del desarrollo de la turbidez (Colgrave *et al.*, 2013). El aporte benéfico (estabilidad de la espuma) o negativo (generación de turbidez) depende en gran medida de la cantidad de hordeínas  $\gamma$  presentes en la malta: un exceso de esta proteína tendrá como resultado la generación de turbidez en la cerveza o incremento de los costos para su clarificación. Esta proteína fue encontrada mayormente expresada en maltas del año 2011, malta M2 del año 2009 y malta M1 del año 2012.

Otras proteínas de defensa detectadas en ambas maltas del año 2011 fueron del tipo quitinasa (**Spot 5507** en M1 y **Spot 7402** en M2). Estas proteínas se expresan como parte del sistema de defensa contra la presencia de patógenos de plantas. Catalizan la degradación de la quitina presente en las células de los hongos patógenos; sin embargo, su acumulación se ha relacionado con la (Liaquat y Apenten. 2008) formación de turbidez inducida por la temperatura en vinos blancos embotellados (Vincenzi *et al.*, 2014). Por lo tanto, sus concentraciones podrían ser indicativas de mala calidad para la cerveza.

#### ***D) Proteínas hipotéticas***

Dentro de este grupo de proteínas identificadas, el **Spot 8610** se encontró en la malta M1 del año 2011. El análisis de 9 secuencias peptídicas reveló una alta similitud con enzimas de las familias de esterasa y lipasa. La función de estas enzimas no ha sido bien definida. Sin embargo, se ha observado que catalizan la hidrólisis de esteres de bajo peso molecular, los cuales son los principales agentes de aromáticos en la cerveza (Liaquat y Apenten. 2008).

El **spot 6604**, presente solo en malta M2 del año 2011, es una proteína predicha con un dominio de la superfamilia de quinasas de azúcar/ proteína de choque térmico 70(HSP70) /actina (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Dentro de estas, la proteína HSP70 ha sido reportada como un alérgeno presente en la cebada y el maíz (Chiung *et al.*, 2000). Estas proteínas se expresan como una respuesta adaptativa a un aumento en la temperatura ambiental (Kruse *et al.*, 1993).

El **Spot 2303**, con una expresión más alta en M2 del 2011, es una proteína predicha con un dominio de doble barril- $\beta$ -psi que se encuentra en alérgenos de polen. Están relacionadas estructural y funcionalmente con las expansinas reportadas en el maíz que promueven el crecimiento y la relajación de la pared celular en plantas y participan en otros procesos, como la germinación de semillas (Anderberg y Walker-Simmons. 1992; Yennawar *et al.*, 2006). No se encontró ningún registro de su relación con ningún parámetro importante en el proceso cervecero.

El **spot 6301**, presente solo en M2 del 2011, es una proteína hipotética similar a la familia de las peptidasas de plantas y bacterias pfam04455. Se cree que estas proteínas son parte del mecanismo de defensa de las plantas contra los patógenos (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). No se encontró información sobre la relación de esta peptidasa con los parámetros de calidad en la malta.

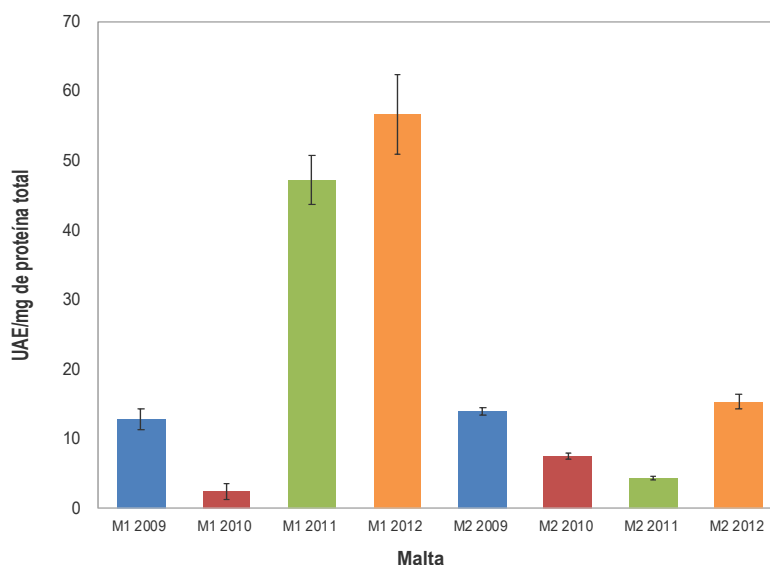
### **I.3.3 Actividad proteolítica**

Durante el malteo, las proteínas de reserva presentes en el grano de cebada son metabolizadas mediante la acción de enzimas proteolíticas en péptidos y aminoácidos que sean accesibles para la levadura (Schmitt y Marinac. 2008). Estas enzimas son activadas durante el proceso de germinación del grano en el malteo y son desactivadas durante el proceso de secado y tostado. Mediante este proceso, se generan subproductos de la hidrólisis que definen las características del mosto, el comportamiento de la levadura durante la fermentación y, finalmente, las características sensoriales de la cerveza.

La presencia, concentración y tipo de actividad son factores críticos para un óptimo desempeño de la producción de cerveza. Zhang y Jones (1995), mediante zimografía, reportaron hasta 40 actividades proteolíticas de las cuales, la mayoría pertenecía al grupo de las cisteín-proteasas. Por esta razón, es importante estudiar las características bioquímicas de cada malta para diferentes variedades (Cai *et al.*, 2013).

#### ***A) Actividad proteolítica general***

La actividad general de proteasas se determinó en solución utilizando azocaseína al 1 % como sustrato según lo reportado por (Secades y Guijarro. 1999). En la figura 2 se presentan los valores detectados para malta de los años 2009 al 2012.



**Figura 2.** Actividad general proteolítica. UAE: Unidades enzimáticas aleatorias.

La malta que presentó mayor nivel de actividad fue la malta 2012 para las dos variedades estudiadas. La malta M1 del año 2011 tuvo casi 11 veces mayor actividad que la detectada para la variedad M2 en el mismo año. Contrario a lo observado en el año 2010, donde la malta M2 tuvo 3 veces mayor actividad que la detectada para la malta M1. Para el 2009 ambas maltas presentaron casi el mismo nivel de actividad.

En los resultados de la identificación de spots se observó que en la malta del 2010 fueron detectados dos inhibidores de proteasas: el inhibidor de tripsina CMe y la Serpina Z4. Interesantemente pudimos observar que las maltas de este año tuvieron los niveles de actividad más bajos, tal vez efecto de la presencia de estos inhibidores que actúan en contra de proteasas endógenas en el grano de malta.

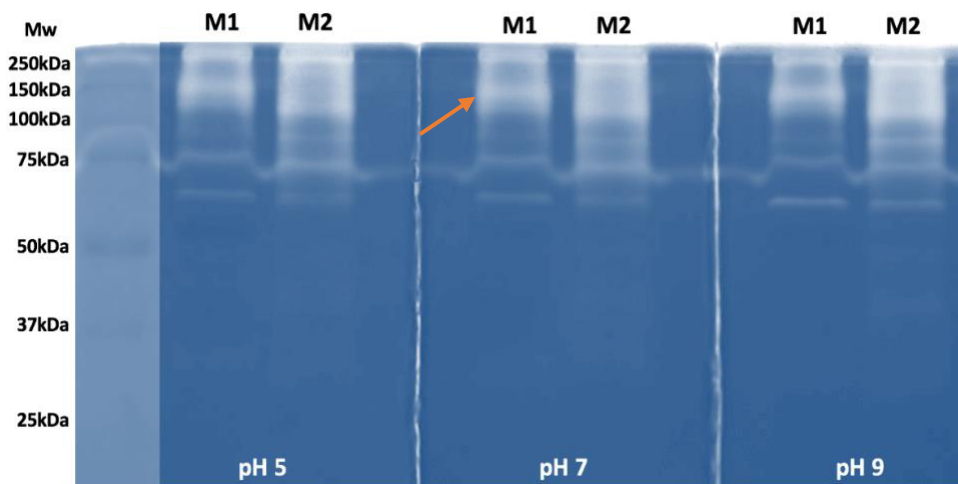
### ***B) Estudios de proteasas y amilasas en la malta 2011 mediante zimogramas***

Para este trabajo, analizamos las actividades del perfil proteolítico y amilolítico mediante zimogramas utilizando sustratos copolimerizados (Wrobel y Jones. 1992).

i) *Zimogramas de proteasas*

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, determinamos que la actividad proteolítica óptima en condiciones nativas estaba en el intervalo de pH de 5.0 a 9.0 (datos no presentados).

Fueron utilizados geles de poliacrilamida con gelatina como sustrato copolimerizado para estudiar la actividad proteolítica de las maltas. Después de incubar los zimogramas durante 20 h a 40 ° C, observamos una marcada diferencia en los niveles de actividad proteasa entre las maltas M1 y M2 (Fig. 3).



**Figura 3.** Perfil proteolítico de maltas M1 y M2 del 2011

Se detectaron bandas de actividad fuerte entre 60 y 250 kDa, y se detectó una banda débil a aproximadamente 40 kDa solo en la malta M2, que coincide con una proteasa alcalina de bajo peso molecular previamente informada en semillas de frijol (Padmakar *et al.*, 2005). Esta banda se observó con mayor claridad a un pH de 9.0. Aunque ambas maltas presentan las mismas bandas de actividad, se pueden observar diferencias en los niveles de intensidad de estas actividades. Además, la malta M2 presentó una actividad más intensa que la malta M1. La malta M1 presentó mayor actividad en la banda de 150 kDa y la malta M2 presentó mayor actividad en la banda de 110 kDa (Grudkowska *et al.*, 2013), describieron bandas de actividad similares en hojas de trigo, donde

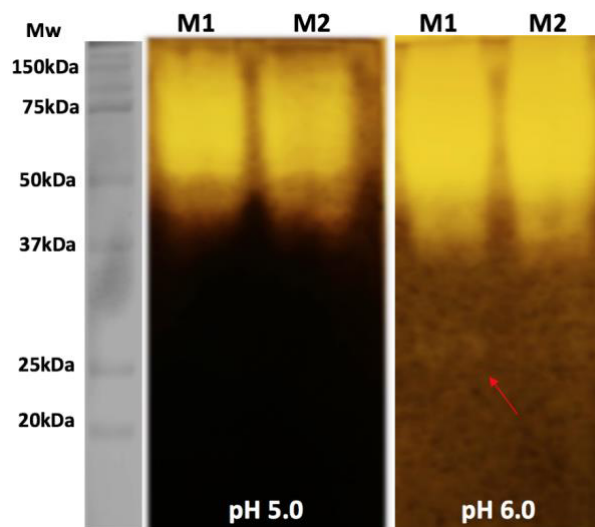
reportan una banda de 150 kDa con actividad metaloproteinasa inhibida por EDTA y una doble banda de peso molecular de 115-118 kDa con actividad de proteinasa aspártica inhibida por pepstatina A.

Los resultados de actividad proteolítica general (Fig. 2) mostraron que la malta M1 tiene un nivel mayor de actividad proteolítica, 10.7 veces mayor que la actividad de la malta M2 por miligramo de proteína total para el año 2011. Estos resultados confirmaron nuestra teoría de que la banda de 150 kDa en la malta M1 juega un rol importante en la actividad proteolítica general., No se observaron diferencias en el nivel de actividad con respecto a su variación con el pH, lo cual es importante ya que la actividad proteolítica se mantiene a los mismos niveles cuando el pH en el medio varía de 5.0 a 9.0. Resultados similares fueron reportados por (Wrobel y Jones. 1993), quienes observaron las bandas de actividad metaloproteasa y serina proteasa presentes en las semillas de cebada después de 4 días de germinación con intervalos de peso molecular elevado (84-220 kDa) que mantuvieron su actividad hasta un pH de 8.5.

#### ii) *Zimogramas de amilasas*

Las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa catalizan la hidrólisis del almidón presente en la malta en azúcares fermentables y contribuyen al "poder diastásico" de la malta, que es un importante factor de calidad de la malta para el proceso de elaboración (Arends *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004). Utilizando zimogramas, evaluamos los perfiles de amilasa a través de la degradación del almidón copolimerizado en geles de poliacrilamida a pH 5.0 y 6.0 (Fig. 4).





**Figura 4.** Perfil de amilasas de maltas M1 y M2 del 2011

Ambas maltas mostraron una región de actividad que osciló entre 50 y 70 kDa a pH 5.0, mientras que a pH 6.0, la región de actividad se amplió de 35 a 100 kDa en ambas maltas. Sorprendentemente, se observó una banda con actividad de aproximadamente 27 kDa a pH 6.0; la banda fue más clara y con mayor intensidad en la malta M1, pero también se detectó una banda muy débil y apenas perceptible en la malta M2. Se ha detectado una banda más intensa y definida con las mismas características que la banda anterior en otra malta de elaboración de cerveza que estamos analizando en la actualidad (datos no mostrados).

Las amilasas reportadas en cereales tienen un peso molecular aproximado de 45-67.2 kDa (The UniProt Consortium. 2015; Uno-Okamura *et al.*, 2004). Sin embargo, reportaron una  $\beta$ -amilasa apoplásica de 25 kDa en plántulas de *Avena sativa*, este es único reporte de una amilasa de bajo peso molecular en plantas. Una de las funciones probables de este tipo de enzima es como chaperonas moleculares y apoyar la actividad de otras enzimas, como las  $\beta$ -glucanasas (Uno-Okamura *et al.*, 2004), las cuales son importantes para el proceso de elaboración de la cerveza. La presencia de  $\beta$ -glucanos en el mosto puede determinar características importantes durante el proceso y la calidad de la cerveza, como la viscosidad (Jin *et al.*, 2004). La presencia más activa de esta amilasa de bajo peso molecular podría ser un indicador de la calidad de la malta.

## I.4 CONCLUSIONES

En este estudio, encontramos diferencias importantes entre las dos variedades de maltas utilizadas (M1 y M2).

- i) En la malta M1 fueron encontradas: enzima de tipo esterasa (spot 8610) relacionado con la hidrolisis de compuestos aromáticos, serpina Z4 (spot 5601) relacionada a la buena calidad de la espuma, mayor actividad proteolítica relacionada a una banda de 150 kDa con alta actividad proteolítica y una banda a 27 kDa la cual no ha sido reportada antes en malta. La proteína ABA (spot 5307), relacionada con inhibidores de enzimas hidrolíticas y una  $\beta$ -amilasa (Spot 5711).
- ii) La familia de las quitinasas (spots 5507 y 7402) presentes en ambas maltas, han sido relacionadas con la apariencia de turbidez que en algunas cervezas es una característica indeseable.
- iii) En la malta M2 fueron detectadas: una  $\beta$ -glucosidasa, correlacionada con un aumento en el poder diastásico y los spots 6604 y 2303, que se han reportado como alérgenos de la malta, lo cual no es un buen indicador de la calidad.
- iv) La malta M1 produce un mayor número de enzimas de tipo hidrolítico, que son beneficiosas para el proceso de elaboración.
- v) La malta M2 produce mayores cantidades de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas relacionadas con la defensa y la tolerancia al estrés que pueden afectar las características del mosto o la cerveza.

Los resultados muestran grandes diferencias entre dos tipos de maltas aparentemente estrechamente relacionadas. Estos parámetros podrían ser utilizados en: i) mejora genética de semillas, ii) establecimiento de criterios de calidad para la selección de maltas para el proceso de elaboración, iii) mejora del manejo de los mostos y procesos, iv) asociación de proteínas con ciertas características de la cerveza y v) seleccionando mezclas de malta según el rendimiento de la levadura.

## **CAPITULO II. FERMENTACIONES Y CALIDAD DE LA CERVEZA**

### **RESUMEN**

En este capítulo se describe los resultados obtenidos de la fermentación de mostos preparados con dos maltas de diferente variedad del año 2011 con el objetivo de: comparar similares formulaciones de mostos teniendo solo la variable de tipo de malta, analizar el desempeño de la levadura durante la fermentación y obtener células de levadura para los análisis de expresión genética descritos en el siguiente capítulo. Además, en continuación con el capítulo anterior, se analiza la relación del proteoma y las enzimas hidrolíticas con los parámetros de calidad obtenidos del mosto.

### **II. 1 INTRODUCCIÓN**

La cerveza es el resultado del metabolismo de la levadura para transformar la glucosa en energía, en forma de ATP, con dos principales subproductos: etanol y dióxido de carbono. Esta cualidad de las levaduras ha sido explotada por el hombre desde hace miles de años, de tal manera que hoy en día alcanza una producción mundial de 1.96 billones de hectolitros en el 2014 (Statistica. 2014).

Durante la primera etapa de la fermentación, la degradación de carbohidratos ocurre a través de la vías de la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Durante esta etapa los carbohidratos son metabolizados en presencia de oxígeno para producir piruvato y ATP. Después el piruvato es oxidado a acetil-CoA y CO<sub>2</sub> a través del ciclo de TCA mientras que el oxígeno esté presente en el medio. Esta etapa sirve como generadora de suficiente energía para que la levadura se reproduzca aumentando su biomasa. Una vez que la cantidad de oxígeno en el medio ha disminuido la acción del ciclo de TCA se reduce dando paso a la fermentación alcohólica, durante esta etapa, el

piruvato es convertido a etanol y CO<sub>2</sub> a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas.

Los dos tipos principales de cerveza son Ale y Lager. Las diferencias entre ellas son la temperatura a la cual fermentan el mosto y por supuesto la levadura. En las cervezas de tipo Ale, la levadura que se utiliza es *Saccharomyces cerevisiae* la cual fermenta a una temperatura entre 18 a 25 °C y tiene la característica de que al final de la fermentación la levadura “sube” a la superficie para después flocular y “caer” al fondo del fermentador (Mertens *et al.*, 2015). Las cervezas de tipo Lager, generalmente las más comunes en el mercado, son fermentadas a bajas temperatura (5-15 °C), la levadura Lager a diferencia de la Ale solo flocula y cae al fondo del fermentador (Walther *et al.*, 2014). Se sabe que las levaduras cerveceras de tipo *lager* son una especie híbrida entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (Baker *et al.*, 2015).

Aunque ambas levaduras tienen la capacidad para fermentar, su metabolismo y la cerveza que generan tienen características muy diferentes. Aunque el etanol es el principal producto de la fermentación se generan otros subproductos que aportaran el carácter de la cerveza.

Entre los subproductos más importantes de carácter aromático se encuentran los alcoholes de fusel, esteres, compuestos carbonilos, diacetilo y compuestos volátiles de azufre. Su producción depende principalmente de la concentración de aminoácidos y nutrientes presentes en el mosto y son aportados por la malta y el metabolismo propio de la levadura.

En este trabajo fueron evaluados dos cepas de levaduras “lager” en fermentaciones con mostos preparados con dos variedades de malta diferente. El objetivo fue hacer una comparación entre las maltas utilizadas y su efecto en la generación de compuestos aromáticos.

## **II.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.2.1 Cepas de levadura**

Dos cepas de levadura cerveceras tipo lager, *S. cerevisiae*, C790 y C820, fueron proporcionadas de la colección de cepas de CCM (Cervecería

Cuauhtémoc-Moctezuma de México). Estas cepas fueron utilizadas para los experimentos de fermentación para evaluar su desempeño utilizando dos mostos preparados con diferente tipo de malta y posteriormente el estudio de la respuesta transcripcional mediante secuenciación.

### **II.2.2 Preparación de los mostos**

Los mostos fueron preparados y evaluados por el personal de planta piloto de CCM. Estos mostos fueron almacenados a 4 °C en condiciones de esterilidad y utilizados en un máximo de 3 días después de ser recibidos. Todas las evaluaciones fueron realizadas por triplicado. Se diseñaron cuatro diferentes formulaciones utilizando las maltas correspondientes al año 2011.

### **II.2.3 Perfil de aminoácidos**

Las muestras para la determinación del perfil de aminoácidos fueron tomadas antes de la inoculación de los mostos en condiciones de esterilidad. Las mediciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio LASEQA del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL utilizando la técnica de Oftaldehído (OPA)-HPLC. Todas las mediciones fueron tomadas por triplicado.

### **II.2.4 Fermentaciones**

Las fermentaciones fueron realizadas por duplicado en condiciones asépticas en probetas de 2 L utilizando los mostos proporcionados por CCM. La densidad del extracto se ajustó a 17°P (grado Plato). La concentración de oxígeno se mantuvo a 1 ppm por cada °P y la concentración de inóculo de levadura fue de  $1.2 \times 10^6$  cel/ml por °P.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo por 7 días a una temperatura inicial de  $11 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  al día 1 y a  $16 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  los días posteriores.

## **II.2.5 Evaluación de parámetros de fermentación**

### ***A) Evaluación de los mostos***

Los mostos fueron evaluados de acuerdo a los métodos analíticos oficiales de la American Society of Brewing Chemists (ASBC, 1996) por el departamento de Química Analítica de CCM.

### ***B) Control microbiológico***

Para determinar si las fermentaciones están libres de contaminación microbiológica que puedan afectar el comportamiento normal de la fermentación, cada tratamiento fue evaluado siguiendo los procedimientos descritos en la ASBC (1996).

En el último día de fermentación se realizaron pruebas microbiológicas con el fin de verificar que no existan microorganismos contaminantes, los medios de cultivo que fueron utilizados son DUBA y MRS.

### ***C) Células en suspensión***

Para evaluar el desempeño de la fermentación fueron analizadas las células en suspensión utilizando una cámara de Neubauer, en la cual se coloca una gota del líquido, se hace el conteo de células en el microscopio con el objetivo de 40X. Los cálculos se realizan con la siguiente formula:

$$\text{Cel/ml} = \text{Células totales (en 25 cuadrantes)} \times \text{dilución} \times \text{mL}$$

### ***D) Diacetilo***

La medición de diacetilo al final de la fermentación fue realizada por de cromatografía de gases siguiendo el procedimiento de la ASBC (1996).

### ***E) Compuestos volátiles***

Ambas determinaciones fueron realizadas en el personal de Química Analítica de CCM.

La determinación de volátiles (acetaldehído, acetato de etilo, acetato de isoamilo y alcoholes isoamílicos) fueron determinada por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), siguiendo los protocolos estandarizados por CCM.

La determinación de compuestos de azufre fue determinada por el método cromatográfico de headspace con detector de quimiluminiscencia para compuestos azufrados. La metodología consiste en una adecuación de lo propuesto por Burmeister *et al.*, (1992) y Métodos de ASBC (ASBC, 1996).

### ***F) Análisis de viabilidad de la levadura***

El porcentaje de células viables fue evaluado mediante el equipo NucleoCounter YC-100 (ChemoMetec).

## **II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **II.3.1 Formulaciones de mostos y variación en perfil de aminoácidos**

Un total de cuatro mostos fueron preparados utilizando maltas del año 2011. Estos mostos fueron preparados y evaluados por la empresa CCM bajo sus propios estándares para alcanzar la máxima calidad posible.

La formulación de cada mosto se basó en lo reportado por (Leal-Guerra. 2011; Quintero-Vásquez. 2011; Pérez-Ortega. 2010) quienes evaluaron diferentes parámetros de fermentación como: temperatura, oxigenación y porcentaje de malta, para analizar la regulación de la expresión genética para la producción de compuestos de azufre y compuestos volátiles de tipo esteres. En estos trabajos se observó que la cepa 820 tiene mejor desempeño en mostos con bajo porcentaje de malta (35%) mientras que la cepa 790 en mostos con altos

porcentajes de malta (50%). Las formulaciones de los mostos y la cepa utilizada para las fermentaciones de cada mosto se describen en la tabla 3.

La fermentación de estos mostos fue realizada siguiendo las condiciones estándares para una cerveza de tipo lager, estas condiciones fueron descritas en la sección de materiales y métodos.

**Tabla 3.** Formulación de los mostos y cepa utilizada

Mosto	Formulación %Malta/%Adjuntos	Malta	Extracto %	Cepa
M35-1	35/65	M1	16.97	820
M35-2		M2	17.00	820
M50-1	50/50	M1	16.82	790
M50-2		M2	17.04	790

### **II.3.2 Control microbiológico, viabilidad y células en suspensión**

Ninguno de los mostos y fermentaciones mostró contaminación por microorganismos contaminantes a lo largo de la fermentación, por lo que la interferencia de este parámetro sobre los resultados fue descartada.

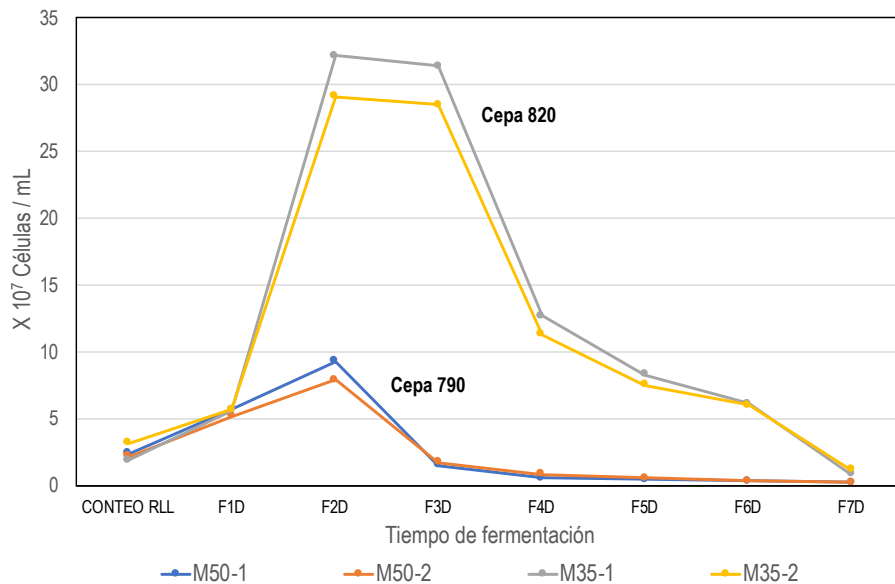
Previo a la inoculación del mosto la cepa 790 y la cepa 820 tuvieron un valor de viabilidad de 95.9 y 97.1% respectivamente. El porcentaje de viabilidad debe ser de al menos 80% para un óptimo desempeño durante la fermentación (Luarasi *et al.*, 2016). El parámetro de células en suspensión durante la fermentación no fue afectado por la variedad de malta utilizada, pero si se observó una marcada diferencia entre cepas (Fig. 5).

Ambas cepas mostraron un crecimiento logarítmico durante los primeros de fermentación. La cepa 790 presenta su máximo crecimiento celular durante el día 2 de fermentación mientras que la cepa 820 presenta un crecimiento máximo al día 2 y se mantiene hasta el día 3. En la figura 3 se puede observar que la cepa 820 tiene un mayor incremento (7 veces mayor) de células en suspensión al día 2 de fermentación, manteniéndose al día 3 y al día 4, el 40 % de sus células



han floculado. En la cepa 790, la mayor cantidad de células fueron alcanzadas al día 2 de la fermentación pero al día 3 el 20 % ya ha floculado casi completamente.

Este mismo comportamiento en ambas cepas fue observado por (Leal-Guerra 2011; Damas-Buenrostro y Pereyra-Alfárez. 2009).



**Figura 5.** Células en suspensión durante el transcurso de las fermentaciones

### II.3.3 Concentración de aminoácidos y nitrógeno libre asimilable

Uno de los parámetros principales evaluados en los mostos es el contenido de alfa amino nitrógeno (FAN). Niveles adecuados de FAN son indispensables para el crecimiento de la levadura y un buen desempeño de la fermentación (Lekkas *et al.*, 2005), variaciones en las concentraciones de FAN se correlacionarán con la concentración de compuestos aromáticos en la cerveza (O'Rourke. 2002).

Fueron obtenidos mostos con diferente nivel de FAN, el cual fue evaluado para los cuatro mostos antes de su inoculación con la levadura (Tabla 4).

**Tabla 4.** Niveles de FAN en mostos

Mosto	mg/l
M35-1	157
M35-2	156
M50-1	196
M50-2	193

Como se puede observar, la variedad de malta no afectó a los valores globales de contenido de FAN en los mostos, pero algunos aminoácidos presentaron diferencias debido a la variedad de malta utilizada (Tabla 5).

En mostos con 35% de malta, la glicina y treonina fueron los aminoácidos con mayor diferencia (1.5 veces y 2.4 veces respectivamente). El resto de los aminoácidos presentaron concentraciones similares utilizando ambas maltas, ligeramente mayor en malta M2.

**Tabla 5.** Concentración relativa de aminoácidos

AA (mg/l)	Mosto M35 Malta M1/M2	Mosto M50 Malta M1/M2	AA (mg/l)	Mosto M35 Malta M1/M2	Mosto M50 Malta M1/M2
Ac. Aspártico	0.8	3.1	Tirosina	0.7	2.3
Ac. Glutámico	1.1	1.2	Metionina	0.9	0.7
Asparagina	1.0	2.3	Valina	1.0	3.1
Serina	1.0	1.8	Triptófano	1.0	0.7
Histidina	1.1	1.1	Fenilalanina	0.8	2.6
Glicina	0.7	0.2	Isoleucina	0.9	2.2
Arginina	0.8	2.0	Leucina	0.8	3.2
Treonina	0.4	3.2	Lisina	1.3	2.3
Alanina	1.4	2.5			

Por el contrario, en mostos con concentraciones de 50% de malta, se observó mayor concentración de casi todos los aminoácidos al utilizar la malta M1 con excepción de la glicina que presentó 6.5 veces más concentración utilizando la malta M2. Esta variación en los resultados respecto al porcentaje de malta utilizado y la concentración de aminoácidos podría deberse al efecto que

tiene la adición de adjuntos al mosto. Los cereales comúnmente utilizados como adjuntos son el maíz, arroz, trigo, avena, cebada no malteada y sorgo, estos sirven para aumentar la fermentabilidad en mostos con bajo porcentaje de malta. Sin embargo, recientes estudios indican que algunos aminoácidos y compuestos nitrogenados provenientes de cereales pueden afectar las características organolépticas e incluso servir como ingredientes principales para la producción de cerveza (Chengye *et al.*, 2016; Marconi *et al.*, 2017; Aleksander *et al.*, 2014).

El metabolismo de aminoácidos durante la fermentación es de gran importancia para la producción de compuestos aromáticos en la cerveza (Ferreira y Guido. 2018). Diversos estudios han relacionado la concentración de aminoácidos con la producción de estos compuestos: incremento en los aminoácidos valina e isoleucina disminuyen la concentración de diacetilo (Krogerus y Gibson. 2013).

Se ha demostrado que la adición de los aminoácidos, valina, leucina, isoleucina e histidina al mosto incrementa la generación de sus respectivos alcoholes de Fusel, los cuales además de impartir ciertas notas aromáticas a la cerveza, son pieza clave para la generación de esteres (Ferreira y Guido. 2018; Sigmund. 1970).

El incremento de asparagina, serina y treonina en el medio ha sido relacionado con un aumento en las concentraciones de sulfito, sulfuro y SO<sub>2</sub> (Hansen y Kielland-brandt. 1996). Dependiendo de la cepa de levadura utilizada, la metionina puede incrementar o inhibir la formación de H<sub>2</sub>S (Duan *et al.*, 2004).

### **II.3.4 Producción de compuestos volátiles**

La producción de compuestos volátiles en la cerveza está regulada principalmente por las características del mosto y la respuesta metabólica de la levadura. La concentración de estos compuestos en las bebidas alcohólicas define su sabor y su aceptación por el consumidor. Lograr el control sobre la producción de compuestos volátiles como esteres, diacetilo y compuestos de azufre, a través del estudio y manipulación de lotes y tipos de materia prima, es el principal objetivo de los cerveceros.

Fueron preparados mostos con diferente variedad de malta para evaluar el efecto de la composición de cada uno sobre la producción de esteres y compuestos volátiles de azufre.

**Tabla 6.** Parámetros monitoreados en la Fermentación

CEPA	C820		C790	
MOSTO	M35-1	M35-2	M50-1	M50-2
FAN (Mosto)	157	156	196	193
Acetato de Etilo (15-20 ppm)	21.65	27.6	36.5	29.95
Acetato de Isoamilo (0.026 ppm)	1.30	1.85	3.40	2.55
Diacetilo	0.21	0.15	0.09	0.13
H <sub>2</sub> S (ppb)	5.65	8.80	6.20	6.55
MetSAc (ppb)	3.55	5.05	6.35	3.40
Microbiológico	-	-	-	-

Muestras de final de fermentación. Promedio de dos mediciones independientes

Los resultados analíticos mostraron que la cepa 820 produce mayor cantidad de compuestos de azufre y esteres en mostos con malta M2.

Mostos preparados para esta cepa con malta M2 mostraron tener mayor concentración de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, relacionados con la producción de esteres. En el caso de los aminoácidos relacionados con la producción de compuestos de azufre, solo la treonina duplicó su concentración al utilizar malta M2, lo que podría indicar que este aumento está relacionado con la producción de compuestos de azufre.

La cepa 790 produjo mayor cantidad de compuestos de azufre y ésteres al fermentar mostos preparados con malta M1. Los aminoácidos valina, leucina, isoleucina e histidina mostraron mayor concentración al utilizar la malta M1, lo cual coincide con un aumento en la producción de esteres. Asparagina, serina y treonina tuvieron mayor concentración en malta M1 y están relacionados con la producción de compuestos de azufre.

## II.4 CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestros resultados de la concentración de aminoácidos en el mosto, podemos concluir lo siguiente:

- i) La cepa 820 produce una mayor cantidad de compuestos volátiles de azufre y ésteres al fermentar mostos con alta concentración de leucina, isoleucina y valina.
- ii) La treonina al estar presente en mayor concentración respecto a los demás aminoácidos, podría estar influenciando en el metabolismo de la cepa 820 para una mayor producción de compuestos de azufre.
- iii) La cepa 790 produjo mayor cantidad de compuestos de azufre y ésteres al fermentar el mosto M1, el cual contiene mayor concentración de valina, leucina, isoleucina e histidina, relacionados con la producción de ésteres.
- iv) Mientras que la alta concentración de asparagina, serina y treonina podrían estar contribuyendo a la generación de compuestos de azufre.
- v) Al parecer la treonina en ambas cepas esta correlacionada a la producción de compuestos de azufre.
- vi) Cada mosto fue formulado específicamente para la levadura que se iba a utilizar, por lo cual el efecto del porcentaje de malta no fue comparado en este estudio.
- vii) Los resultados de ambas cepas coinciden perfectamente con lo descrito en la literatura sobre el metabolismo de aminoácidos para la generación de compuestos aromáticos en la cerveza y nos da información importante sobre la variedad de malta que debe ser utilizado según la formulación/cepa que se va a utilizar en el proceso.

## CAPITULO III. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA LEVADURA

### RESUMEN

Este capítulo describe los resultados del análisis de la respuesta genética de la levadura sobre la producción de compuestos volátiles que afectan la calidad de la cerveza. Los genes y rutas metabólicas que presentaron expresión diferencial son analizados y relacionados con las concentraciones de aminoácidos de los mostos del capítulo anterior. Observamos importantes diferencias entre las cepas y su sensibilidad a la variedad de malta utilizada al regular diferentes rutas metabólicas.

### III.1 INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación alcohólica, la células de levadura sufrirán una serie de condiciones de estrés, y su sobrevivencia dependerá de su capacidad de adaptación hacia tales condiciones (Rossouw y Bauer. 2009). Cada levadura cervecera responderá de diferente manera ante tales condiciones, activando o desactivando genes en diferentes rutas metabólicas y generara subproductos que formaran parte de las características de la cerveza.

La levadura que se utiliza para la producción de cervezas de tipo lager es una especie híbrida entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces eubayanus* (De León-Medina *et al.*, 2016). En estudios recientes se ha clasificado a las cepas lager en dos tipos principales: grupo I (Saaz) y grupo II (Frohberg), de acuerdo al porcentaje de identidad con *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces no-cerevisiae*, los sitios de recombinación genómica y número de cromosomas (Monerawela y Bond. 2017). En este estudio se clasificó a la cepa 790 como perteneciente al grupo II. Y se caracteriza por poseer un porcentaje de identidad a *Saccharomyces cerevisiae* mayor que el encontrado en el grupo I. Actualmente la cepa 820 está siendo analizada para determinar su clasificación.

Aunque cada grupo de cepas lager comparten muchas características genéticas, no hay ninguna cepa que se comporte igual que otra en condiciones de fermentación. Aunado a las características genéticas de la levadura, debemos considerar las características de la malta, que definirán los componentes disponibles en el mosto.

Se ha mencionado en el capítulo anterior como la producción de compuestos volátiles es influenciada por las concentraciones de aminoácidos, variedad de malta y la cepa de levadura utilizada. Por lo tanto, el estudio de la respuesta genética de la levadura revelará los mecanismos que utiliza para su adaptación y supervivencia a las condiciones de fermentación. Además, nos dará importantes claves sobre como manipular estos mecanismos para tener un mejor control durante el proceso.

## **III.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.2.1 Extracción de ARN total**

El ARN total fue extraído a partir de células en suspensión al segundo día de la fermentación, siguiendo el protocolo PureZol (Bio-Rad. Hércules, CA. EUA). Los componentes celulares (ADN, ARN y proteínas) fueron separados en tres fases, el ARN fue recuperado a partir de la fase acuosa.

### **III.2.2 Purificación de ARN**

El ARN extraído fue purificado por columna utilizando el estuche comercial (kit) “HighPure RNA Isolation” (Roche. Maryland. EUA). Posteriormente, el ARN purificado fue tratado con inhibidor de RNAsas (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen) y almacenado a -80° C.

### **III.2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN**

1. Óptico: midiendo la absorbancia a 260 nm en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
2. Fluorescencia: utilizando el estuche comercial basado en Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (Invitrogen) en un equipo Qubit Fluorometer (Invitrogen)

La calidad del ARN fue determinada en la estación automática de electroforesis en microfluidos Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), utilizando los reactivos Agilent RNA 6000 Nano Kit. Los resultados fueron evaluados con el programa (software) 2100 Expert Agilent para analizar la integridad del ARN. Las muestras fueron seleccionadas en base al criterio de calidad, definido como el Número de Integridad del ARN (RIN o RQI) debe ser  $\geq 8.0$ .

### **III.2.4 Preparación de la librería para determinar la secuencia nucleotídica del ARN**

La librería para secuenciación de ARN fue preparada utilizando el kit “TruSeq RNA Sample Preparation” (Illumina) y utilizando 2 µg de ARN total. Los principales pasos de la preparación de la librería se describen a continuación:

1. Purificación de ARN mensajero y fragmentación
2. Síntesis de la primera cadena de ADN complementario
3. Síntesis de la segunda cadena de ADN complementario
4. Reparación de extremos y adenilación de extremos 3'
5. Ligación de adaptadores e índices
6. Enriquecimiento de la librería (PCR)

### **III.2.5 Validación de la librería para secuenciación**

Este proceso consiste en dos etapas: análisis de concentración y validación del tamaño

La concentración de la librería fue determinada mediante qPCR con el kit “KAPA Library Quant” (Kapa Biosystems). La validación del tamaño se realizó



por medio del Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando el kit “DNA High Sensitivity”.

### **III.2.6 Secuenciación nucleotídica**

Las librerías fueron secuenciadas utilizando el kit “MiSeq Reagent” de 300 ciclos, siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (Illumina). En breve: la librería fue ajustada a 4 nM y desnaturalizado con NaOH, 0.2 N. Posteriormente, neutralizado y ajustado a 10 pM. La librería fue añadida al cartucho de reactivos en la sección correspondiente y secuenciada en un equipo MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina).

### **III.2.7 Análisis de resultados**

#### ***A) Alineamiento con la referencia *Saccharomyces cerevisiae* S288C***

Para este alineamiento se utilizó la aplicación RNA-Seq Alignment versión 1.0.0 que es parte de las aplicaciones encontradas en BaseSpace de Illumina. La aplicación integra las siguientes herramientas:

- ISIS versión 2.6.25.11, para el análisis de las métricas de la secuenciación
- STAR versión STAR\_2.5.0a, para el alineamiento contra la referencia
- Issac Variant Caller versión 2.3.13-31, para la identificación de variantes, SNV, Indels.
- BEDTools versión 2.17.0, herramienta para integrar e interpretar datos
- Cufflinks versión 2.2.1 para la estimación de genes y transcritos
- Blast versión 2.2.26+, para la comparación de secuencias

#### ***B) Ensamblaje de novo***

Las lecturas obtenidas de la secuenciación fueron ensambladas *de novo* para encontrar secuencias (transcritos) no incluidas en las bases de datos de referencia (Octubre 2013).

El ensamblaje *de novo* y análisis de transcritos diferencialmente expresados, fue realizado con el paquete bioinformático “Trinity” (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>. Octubre 2013).

El “Trinity” está compuesto por varios 'módulos' que hacen el ensamblaje y el análisis. El ensamblaje se basa en el algoritmo de “Bruijn graph”, en el que cada lectura se parte en k-mers de  $n$  nucleótidos. En el ensamblaje, se divide en tres fases:

- Inchworm: Ensambla las lecturas formando contigs
- Chrysalis: Realiza un refinamiento del ensamblaje anterior mediante la creación de grupos de contigs que comparten al menos un k-1 mer y lecturas que unan dichos contigs. Al final arma gráficos de “Bruijn” para cada grupo.
- Butterfly: Toma los gráficos de “Bruijn” de Chrysalis y corta los extremos dudosos, procesa las lecturas de los gráficos y al final presenta parálogos de los transcritos representados en cada gráfico, reportando las isoformas encontradas de cada transcrito.
- Bowtie: Realiza un alineamiento juntando todos los transcritos (contings) encontrados en cada condición a comparar para obtener una lista de transcritos expresados.
- edgeR: Estima la abundancia de los transcritos para cada condición y hace el análisis estadístico de los transcritos diferencialmente expresados. Los parámetros que tomamos para el estadístico fueron:  $p=0.001$  (cambio de 4 veces) y  $p=0.05$  (cambio de 2 veces).

### ***C) Anotación de genes y predicción de funciones***

Las secuencias obtenidas del ensamblaje *de novo* fueron anotados y analizados mediante el software Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005; Conesa y Gotz. 2008). La anotación fue realizada con la comparación en el GenBank con el algoritmo BLASTx (Octubre 2013) (Altschul *et al.*, 1990). La predicción de funciones se realizó mediante la asignación de ontología genética y predicción de rutas metabólicas en “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome” (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2000). Los resultados de la asignación por ontología genética

fueron graficados con el software WEGO (Ye *et al.*, 2006). El estudio de asociación de genes se realizó por medio de lavase de datos STRING (Szkarczyk *et al.*, 2017) y la función de genes fue consultada en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (Cherry *et al.*, 2012).

### **III.3 RESULTADOS**

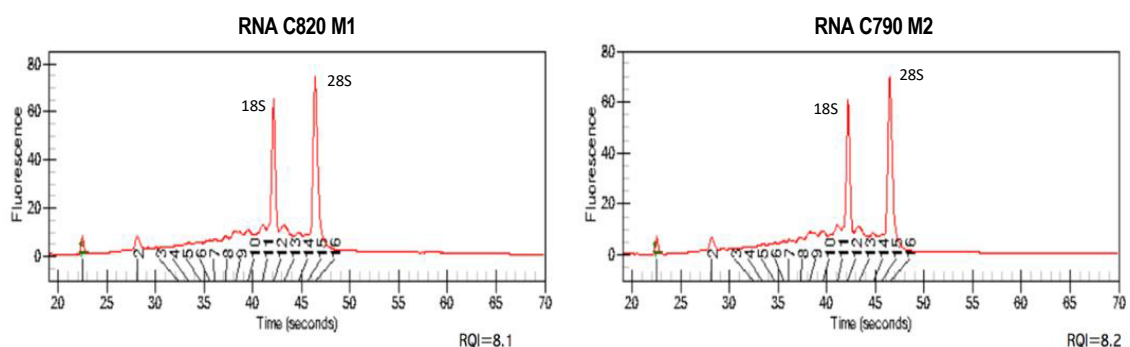
#### **III.3.1 Extracción de ARN**

Cuatro mostos con diferente formulación fueron fermentados. Los mostos fueron oxigenados en condiciones de esterilidad e inoculados con una concentración final aproximada de  $2.1 \times 10^7$  células por mililitro utilizando la cepa 790 para las formulaciones M50-1 (mosto 50% malta M1) y M50-2 y con la cepa 820 para las formulaciones M35-1 y M35-2.

El análisis microbiológico (WLD y CLBM) de la levadura de inóculo y durante los días 4 y 6 de transcurrida la fermentación, mostró ausencia de microorganismos contaminantes. El ARN total fue purificado a partir del segundo día de fermentación, (10 extracciones independientes para cada experimento). Otra parte de las células fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El RNA total extraído fue analizado y cuantificado mediante espectrofotometría, con lo que se observó una alta pureza ( $A_{260}/A_{280}=1.6-2.1$ ) y mediante chip de microfluído (Agilent 2100 Bioanalyzer) se evaluó el patrón, distribución e integridad de tamaños (Figura 6).

En base a la integridad observada que fue muy similar en cada extracción ( $RQI \geq 8$ ) de cada condición se decidió trabajar con dos alícuotas de cada experimento las cuales presentaban una mayor concentración determinada por espectrofotometría. Las muestras fueron cuantificadas (Tabla 7) nuevamente mediante fluorescencia utilizando el kit Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (Invitrogen).



**Figura 6.** Electroferograma representativo de la integridad del RNA.

**Tabla 7.** Concentración de RNA total

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)
M50-2 a	40.70
M50-2 b	39.20
M50-1 a	64.10
M50-1 b	67.50
M35-2 a	181.5
M35-2 b	192.2
M35-1 a	123.3
M35-1 a	131.6

### III.3.2 Secuenciación del transcriptoma

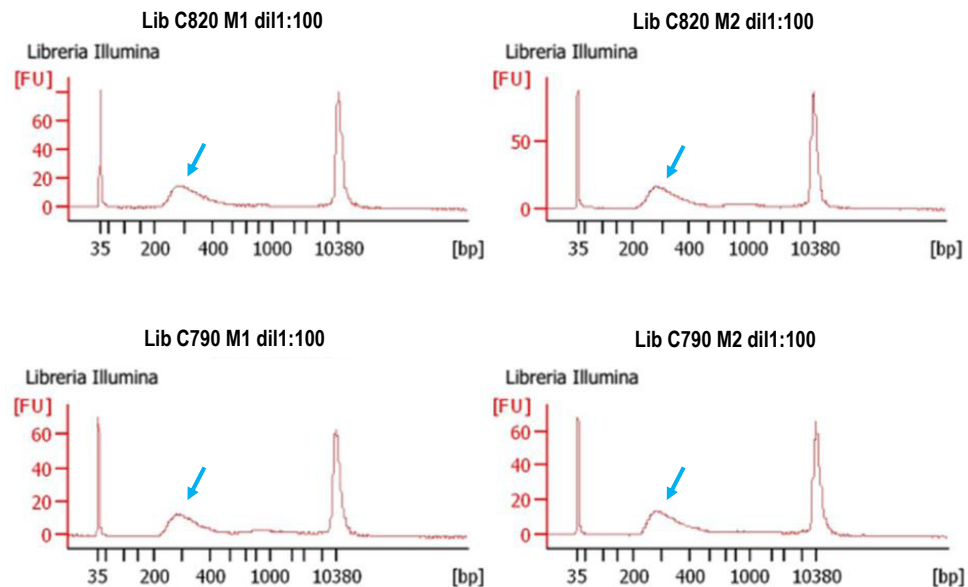
Para la preparación de las librerías de secuenciación se utilizó el sistema TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina) partiendo de 2  $\mu$ g de RNA total, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Para su identificación y como parte del protocolo de secuenciación de RNA, as librerías generadas fueron etiquetadas con los índices presentados en la tabla 8.

**Tabla 8.** Índices utilizados en las librerías de RNA

Librería	Index
M50-2	016
M50-1	007
M35-2	004
M35-1	002

Las librerías fueron resuspendidas en un volumen final de 31  $\mu$ l de los cuales se tomó 1  $\mu$ l para diluirlo 1:100, con el objetivo de analizar el tamaño mediante electroferograma (Fig. 7). El tamaño para este tipo de librería debe ser aproximadamente 250-300 pb.



**Figura 7.** Electroferogramas de las librerías para secuenciación.

Las librerías fueron cuantificadas por PCR cuantitativa utilizando el kit KAPA Library Quant (Kapa Biosystems). Los resultados de la cuantificación se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Concentración de las librerías para secuenciación de transcriptoma

Librería	Concentración (nM)
M50-2	72.51
M50-1	151.88
M35-2	60.96
M35-1	147.16

La secuenciación fue realizada con un equipo MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina), siguiendo los protocolos descritos por el fabricante. Este proceso se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)- Cinvestav- Irapuato.

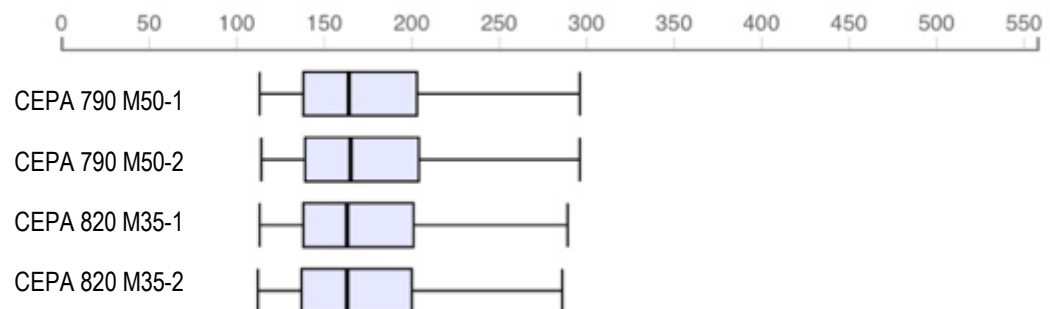
### III.3.3 Calidad y lecturas obtenidas de la secuenciación

El transcriptoma de la levadura fue secuenciado obteniéndose un total de 21 millones de lecturas, correspondientes a 5.5 Gpb. La distribución de las lecturas en cada condición se presenta a continuación en la tabla 10.

**Tabla 10.** Distribución de las lecturas obtenidas por secuenciación

21 millones de lecturas (5.5 Gpb)			
90% con Q>30			
790		820	
2.2 Gpb (8.4 millones lecturas) 40%		3.3 Gpb (12.6 millones lecturas) 60%	
Mosto 50-1	Mosto 50-2	Mosto 35-1	Mosto 35-2
18%	22 %	19 %	41%

El tamaño de los insertos secuenciados fue de aproximadamente 165pb (tamaño de los fragmentos de librería menos las secuencias de adaptadores e índices de secuenciación) (Fig. 8).



**Figura 8.** Tamaño de los insertos en pb de cDNA secuenciados

### III.3.4 Alineamiento con genoma de referencia *Saccharomyces cerevisiae*

Fue realizado un alineamiento tomando como referencia el transcrito de *Saccharomyces cerevisiae* S288C, esto con la finalidad de comparar el porcentaje de regiones codificantes y no codificantes alineadas a la referencia. Este alineamiento se realizó con la aplicación de RNA-Seq Alignment (BaseSpace Workflow) version 1.0.0 disponible en el BaseSpace de Illumina, los resultados se presentan en la tabla 11.

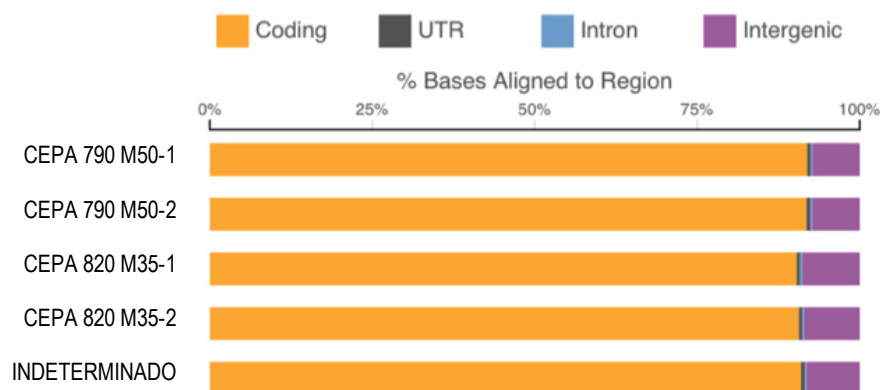
**Tabla 11.** Reporte del Alineamiento contra la referencia *S. cerevisiae* S288C

	<b>C820-M35-2</b>	<b>C820-M35-1</b>	<b>C790-M50-1</b>	<b>C790-M50-2</b>
<b>Longitud de lecturas</b>	151.00	151.00	151.00	151.00
<b># lecturas (simples)</b>	7,832,267.00	3,621,745.00	2,851,882.00	4,292,435.00
<b>Bases (GB)</b>	1.12	0.52	0.41	0.61
<b>Q30 Bases (GB)</b>	1.02	0.47	0.37	0.56
<b>Inserto (bp)</b>	179.45±59.64	178.81±60.16	177.06±57.89	176.15±57.10
<b>Duplicados (% lecturas)</b>	13.84	10.14	8.95	11.57
<b>% Lecturas alineadas</b>	62.49	62.47	59.36	59.40
<b>% Lecturas no alineadas</b>	37.51	37.53	40.64	40.60
<b>% Bases Codificantes</b>	91.81	91.91	90.32	90.67
<b>% Bases UTR</b>	0.01	0.56	0.52	0.52
<b>% Bases Intrones</b>	0.31	0.30	0.34	0.30
<b>% Bases Intergenicas</b>	7.29	7.23	8.83	8.51
<b># Genes 100X cobertura</b>	1,063.00	548.00	438.00	592.00
<b># Genes 30X cobertura</b>	2,918.00	1,594.00	1,283.00	1,716.00
<b># Genes 10X cobertura</b>	4,947.00	3,605.00	3,054.00	3,789.00
<b>Variantes heterocigotas</b>	4,378.00	3,679.00	6,392.00	7,331.00
<b>Variantes homocigotas</b>	40,784.00	36,225.00	34,286.00	36,541.00
<b>SNV</b>	43,462.00	38,820.00	39,616.00	42,502.00
<b>Indel</b>	1,809.00	1,151.00	1,142.00	1,479.00
<b>Transiciones/Transversiones</b>	3.10	3.20	3.20	3.20
<b>Fusiones (gen1/gen2)</b>	TAF4/PLB1	No	FLO10/YHR213W	No

Del total de lecturas para cada condición, pudimos observar que aproximadamente un 60% alineo contra las secuencias de referencia. Esto significa que estas lecturas son altamente homólogas a las secuencias encontradas en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* S288C y el 40% de las lecturas restantes corresponden a otras especies, probablemente a otras secuencias de *Sacharomyces sp.* Sabemos que la cepa 790, como la mayoría de las levaduras cerveceras, es un híbrido entre *S. cerevisiae* y *Saccharomyces eubayanus*, el 54% de su genoma corresponde a *S. cerevisiae* y el 43% a *S. eubayanus* (De León-Medina *et al.*, 2016) esto concuerda con los resultados obtenidos de este análisis.

Un resultado interesante es el análisis de fusiones de los genes. En la cepa 790 se encontro que el gen FLO10 se encuentra fusionado al gen YHR213W. Ambos genes codifican para floculinas (proteínas de membrana encargadas de la floculación al final de la fermentación). Esto concuerda con los resultados obtenidos por (Damas-Buenrostro *et al.*, 2008). En ese estudio, se analizaron los genes involucrados en la floculación, de los cuales el gen FLO10 no pudo ser detectado por PCR para la cepa 790.

La preparación de la librería fue dirigida solo a las secuencias codificantes, aunque se espera que un leve porcentaje de material genético no codificante sea secuenciado. En la figura 9 se puede observar que más del 90% de las lecturas corresponden a secuencias codificantes con poco porcentaje de secuencias intrónicas o no codificantes.



**Figura 9.** Alineamiento del transcriptoma contra la referencia *S. cerevisiae* S288C. Porcentaje de bases alineadas a secuencias codificantes se representan en amarillo



Con esto podemos asegurar que las lecturas obtenidas, resultado de la secuenciación tienen una alta calidad y confiabilidad en la representación del transcriptoma para los siguientes análisis.

### III.3.5 Ensamblaje de novo y anotación de genes

Debido a que un gran porcentaje de lecturas no se alinean contra las secuencias de referencia y la mayoría de estas corresponden a secuencias codificantes, se decidió hacer un ensamblaje *de novo*. El ensamble de las lecturas y el análisis de expresión de los resultados se realizó utilizando la plataforma Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) (Haas *et al.*, 2013). Para el ensamblaje combinamos las lecturas de la condición “comparaciones de malta”, M1 y M2, de cada cepa (790 y 820), resultando en un pool de los transcritos independiente de la condición. Posteriormente, realizamos un alineamiento con Bowtie (parte de la plataforma “Trinity”) de las lecturas de cada condición (ejemplo, mosto con malta M1 "condición M1") contra todos los transcritos del pool de la cepa. Posteriormente, llevamos a cabo lo mismo con la otra condición (condición M2).

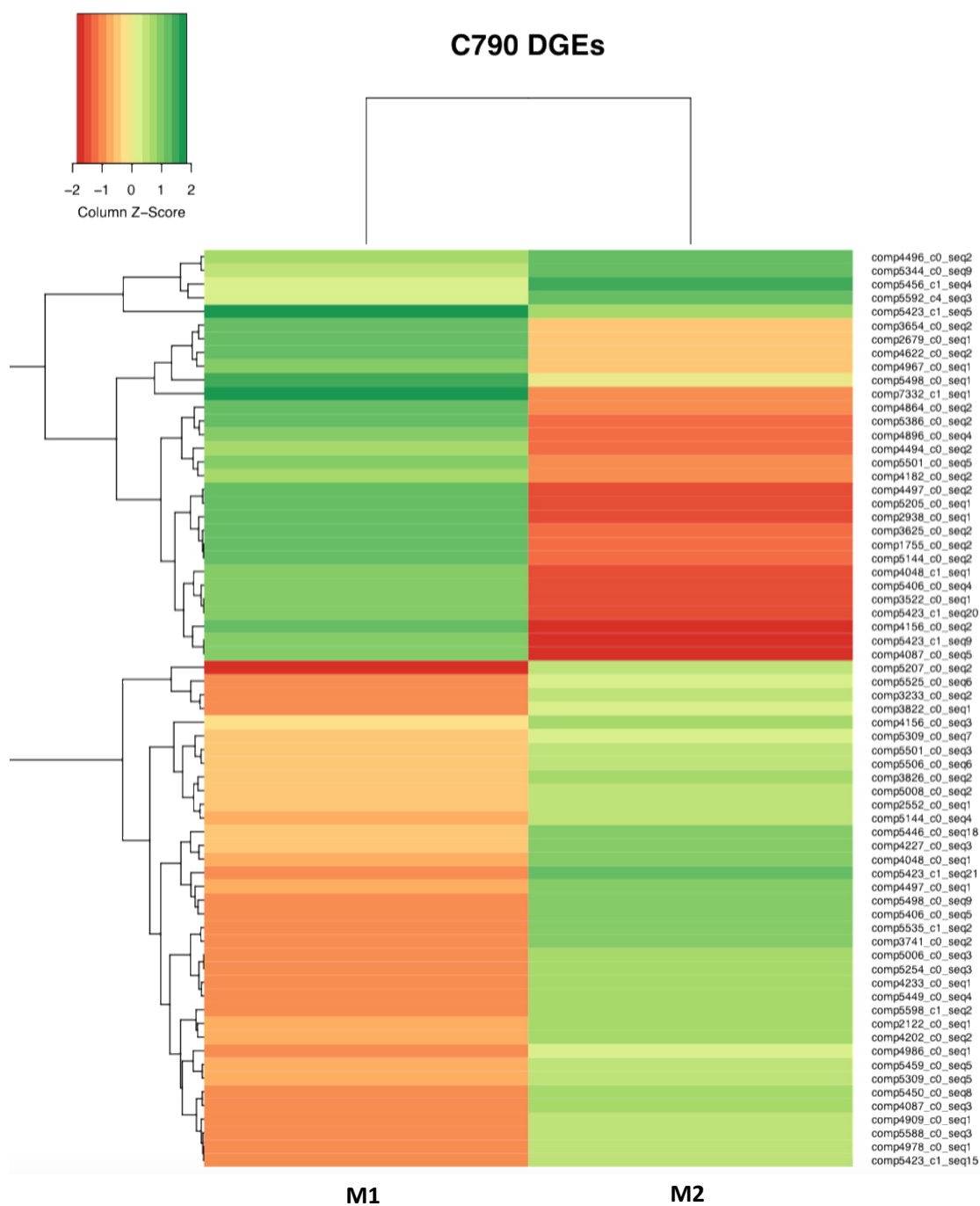
Finalmente, se realizó una estimación de la abundancia de los transcritos para cada condición y después un análisis estadístico de los transcritos diferencialmente expresados utilizando la herramienta edgeR (parte de la plataforma Trinity). El mapeo y anotación de los genes diferencialmente expresados fue obtenido con “Blast2GO PRO”, utilizando los parámetros predefinidos. El total de genes y transcritos ensamblados, así como la mediana del tamaño de los contigs (N50) para cada cepa se presenta en la tabla 12.

**Tabla 12.** Ensamblaje de novo de secuenciación de transcriptomas

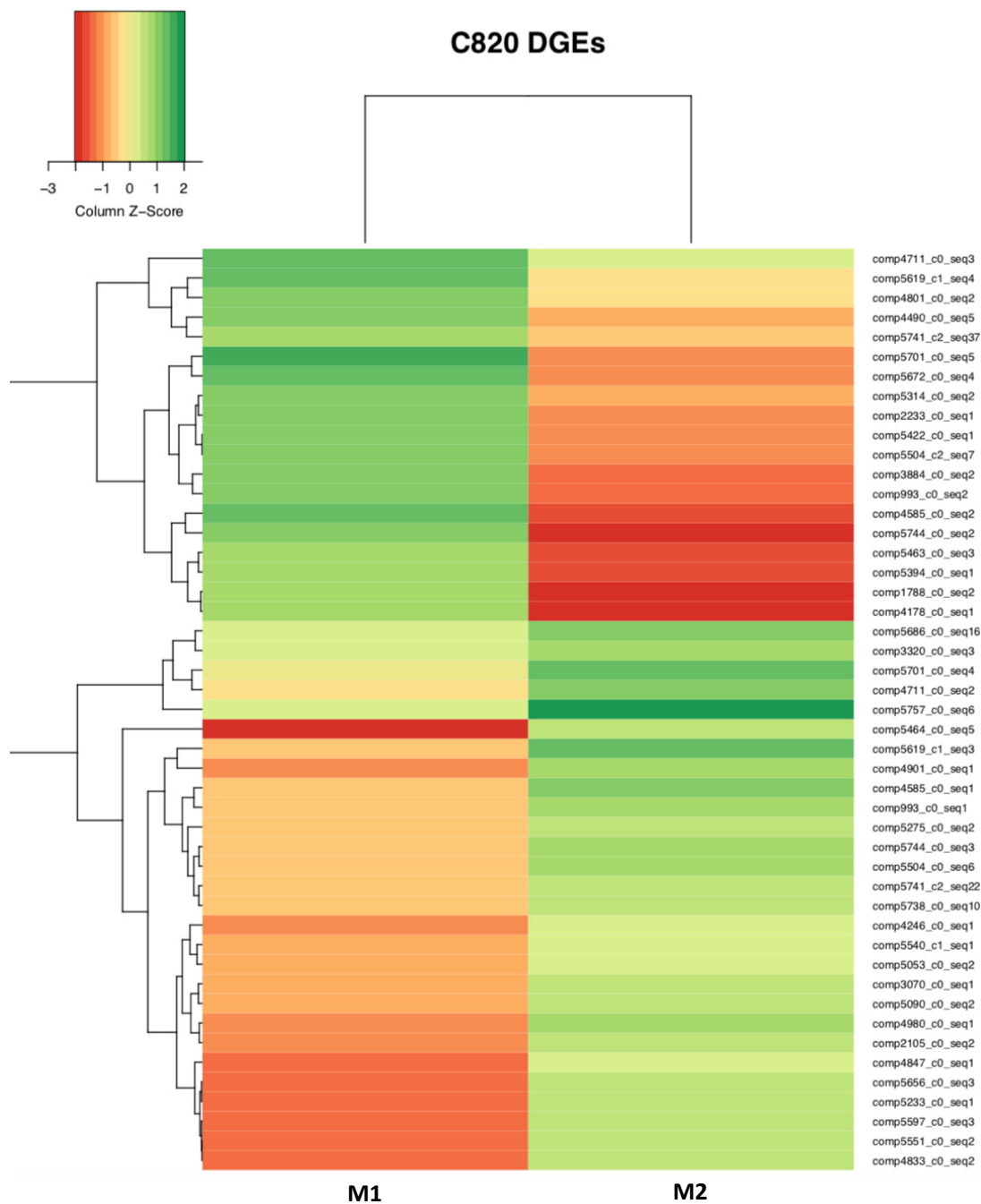
<b>Cepa 790 en mostos con 50% de malta</b>	
Total de transcritos (isoformas)	16121
Total de genes hipotéticos	12849
N50	2503
<b>Cepa 820 en mostos con 35% de malta</b>	
Total de transcritos (isoformas)	14934
Total de genes hipotéticos	12355
N50	2570

### **III.3.6 Análisis de genes diferencialmente expresados**

Se realizó un análisis de expresión diferencial para cada cepa con una significancia de  $p=0.001$  (altamente significativa con un cambio de C2:  $2^2$  o 4 veces) y con una significancia de  $p=0.05$  (con un cambio de C1:  $2^1$  o 2 veces). En las siguientes figuras se presenta visualmente el resultado de todos los genes diferencialmente expresados con un valor estadístico de al menos  $p=0.05$ . Los resultados para la cepa 790 se presentan en la figura 10 y para la cepa 820, los resultados se presentan en la figura 11. Los valores de expresión se pueden consultar en el Anexo B.



**Figura 10.** Genes diferencialmente expresados en la cepa 790 ( $p=0.05$  y  $p=0.001$ ). En verde se presentan los genes con mayor expresión

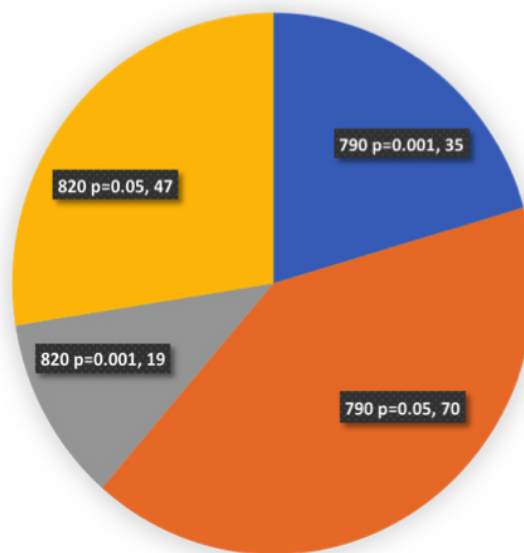


**Figura 11.** Genes diferencialmente expresados en la cepa 820 ( $p=0.05$  y  $p=0.001$ ). En verde se presentan los genes con mayor expresión

Para la cepa 790 en mostos con 50% de malta y  $p=0.001$  se encontraron 35 transcritos diferencialmente expresados respecto a la variedad de malta utilizada. Mientras que en mostos con 50% de malta y  $p=0.05$  se encontraron 70

transcritos diferencialmente expresados respecto a la variedad de malta utilizada. Para la cepa 820 en mostos con 35% de malta y  $p=0.001$  se encontraron 19 transcritos diferencialmente expresados respecto a la variedad de malta utilizada. Para mostos con 35% de malta y  $p=0.05$  se encontraron 47 transcritos diferencialmente expresados respecto a la variedad de malta utilizada. En la figura 12 se pueden visualizar estos resultados.

Los nombres de las secuencias con expresion diferencial se pueden encontrar en las tablas del Apendice A.

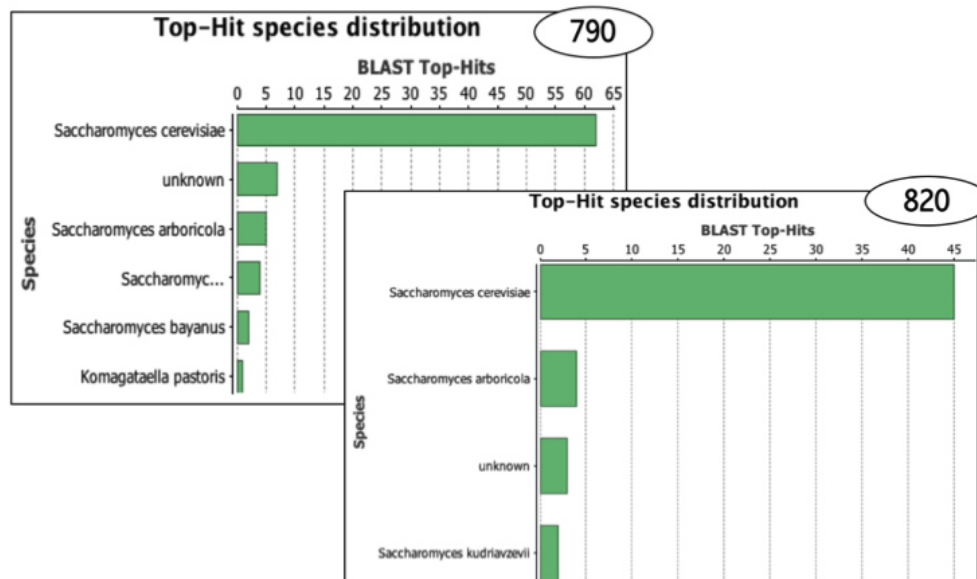


**Figura 12.** Número de transcritos diferencialmente expresados por cepa y nivel de significancia

### ***A) Anotación de genes diferencialmente expresados***

Mediante comparación de las secuencias de las bases de datos por Blast (NCBI) pudimos observar las secuencias ensambladas para ambas cepas tenían alrededor del 62 % y 45 % de homología con *S. cerevisiae* para la cepa 790 y 820 respectivamente. Las secuencias restantes tenían alta homología con especies de *Saccharomyces* sp. Esto parece indicar que la cepa 790 tiene mayor porcentaje de secuencias homologas a *S. cerevisiae* en comparacion con la 820.

Resultados para la cepa 790 y 820 se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Distribución de homología de secuencias analizadas para las cepas 790 y 820

La anotación se realizó con el software Blast2GO PRO utilizando las bases de datos de Gene Ontology, Blast (NCBI), Interpro (EBI) y KEGG. En las siguientes tablas (13 y 14) se muestra la anotación las secuencias expresadas diferencialmente para cada cepa de acuerdo al valor de significancia estadística establecida.

Tabla 13. Anotación de transcritos diferencialmente expresados significativamente para la cepa 790

Secuencia	Gen	Longitud pb	gi	UNIPROT	% Similitud
<b>Cepa 790 p=0.001 (35 transcritos)</b>					
comp5423_c1_seq20	ptp3p	5159	259145990	CAY79250	90
comp5592_c4_seq3	ice2p	3251	401625304	EJS43319	97
comp4909_c0_seq1	spt14p	4385	349581644	GAA26801	99
comp5449_c0_seq4	tna1p	5090	398366337	NP_011777	94
comp5386_c0_seq2	mam3p	3731	151945574	EDN63815	100
comp5588_c0_seq3	pyruvate carboxylase	5483	151943742	EDN62052	98
comp5446_c0_seq18	csm2p	1535	151943034	EDN61369	100
comp4864_c0_seq2	hca4p	4748	401625093	EJS43118	96
comp4156_c0_seq3	fzo1p	2665	190408670	EDV11935	100
comp4497_c0_seq2	hsv2p	5388	349578429	GAA23595	99
comp4227_c0_seq3	bmh1p	1808	151942087	EDN60443	99
comp5144_c0_seq2	fcy2p	3242	323305237	EGA58984	98
comp5535_c1_seq2	hrt3p	1707	6323126	NP_013198	100
comp3741_c0_seq2	elp4p	1396	323302735	EGA56541	99
comp4233_c0_seq1	sds24p	6331	401838226	EJT41952	85
comp4156_c0_seq2	fzo1p	2634	190408670	EDV11935	100
comp5423_c1_seq15	ptp3p	4864	259145990	CAY79250	90
comp4087_c0_seq5	nup133p	3484	190409894	EDV13159	99
comp5598_c1_seq2	-	0	-	-	-
comp5450_c0_seq8	sgs1p	6526	6323843	NP_013914	95
comp2679_c0_seq1	cue3p	2980	256273202	EEU08149	88
comp5406_c0_seq5	enb1p	4159	207341499	EDZ69539	96
comp5205_c0_seq1	shm1p	2126	401626783	EJS44705	97
comp2938_c0_seq1	med1p	1906	6325327	NP_015395	100
comp4202_c0_seq2		5656	401841383	EJT43781	95
comp5501_c0_seq5	osh2p	4541	151941974	EDN60330	99
comp5207_c0_seq2	icl2p	4127	349581822	GAA26979	99
comp5423_c1_seq21	ptp3p	2509	323337965	EGA79204	100
comp7332_c1_seq1	sdt1p	2393	303325148	3NUQ_A	99
comp4497_c0_seq1	hsv2p	5450	349578429	GAA23595	99
comp5459_c0_seq5	enp2p	5260	323337502	EGA78749	99
comp4087_c0_seq3	-	0	-	-	-
comp5008_c0_seq2	ykl187c-like protein	4790	207343675	EDZ71068	99
comp5456_c1_seq4	rpl21ap	433	6325178	NP_015246	100
<b>Cepa 790 p=0.05 (70 transcritos)</b>					
comp4496_c0_seq2	trm12p	2736	207342458	EDZ70219	88
comp2552_c0_seq1	boi1p	1940	259144760	CAY77699	99
comp5592_c4_seq3	ice2p	3251	401625304	EJS43319	97
comp4909_c0_seq1	spt14p	4385	349581644	GAA26801	99
comp5449_c0_seq4	tna1p	5090	398366337	NP_011777	94
comp5588_c0_seq3	pyruvate carboxylase	5483	151943742	EDN62052	98

Secuencia	Gen	Longitud pb	gi	UNIPROT	% Similitud
comp5501_c0_seq3	osh2p	2452	151941974	EDN60330	100
comp4978_c0_seq1	pho84p	2624	401624424	EJS42481	97
comp4156_c0_seq3	fzo1p	2665	190408670	EDV11935	100
comp4497_c0_seq2	hsv2p	5388	349578429	GAA23595	99
comp4227_c0_seq3	bmh1p	1808	151942087	EDN60443	99
comp5144_c0_seq2	fcy2p	3242	323305237	EGA58984	98
comp4048_c0_seq1	syh1p	1250	28564099	AAO32428	89
comp5423_c1_seq5	40s ribosomal protein s24	2292	323337965	EGA79204	100
comp3233_c0_seq2	sto1p	2768	365759032	EHN00846	96
comp3741_c0_seq2	elp4p	1396	323302735	EGA56541	99
comp5598_c1_seq2	-	0	-	-	100
comp4986_c0_seq1	gyp1p	4114	151945694	EDN63935	99
comp5344_c0_seq9	arf2p	1752	6320009	NP_010089	100
comp5205_c0_seq1	shm1p	2126	401626783	EJS44705	97
comp2938_c0_seq1	med1p	1906	6325327	NP_015395	100
comp3625_c0_seq2	mms2p	1013	6321351	NP_011428	100
comp3826_c0_seq2	ypl066w-like protein	1533	401623264	EJS41369	90
comp5207_c0_seq2	icl2p	4127	349581822	GAA26979	99
comp2122_c0_seq1	pds1p	1302	349577178	GAA22347	100
comp5506_c0_seq6	rmd11p	4150	151944177	EDN62469	98
comp5423_c1_seq21	ptp3p	2509	323337965	EGA79204	100
comp5459_c0_seq5	enp2p	5260	323337502	EGA78749	99
comp5006_c0_seq3	glycogen synthase	1049	401625908	EJS43889	96
comp4087_c0_seq3	nup133p	3546	190409894	EDV13159	99
comp3654_c0_seq2	mitochondrial 54s ribosomal protein 24 14	1295	151945896	EDN64128	100
comp5008_c0_seq2	ykl187c-like protein	4790	207343675	EDZ71068	99
comp5456_c1_seq4	rpl21ap	433	6325178	NP_015246	100
comp3822_c0_seq1	alg1p	5299	151946502	EDN64724	100
comp5423_c1_seq20	ptp3p	5159	259145990	CAY79250	90
comp5386_c0_seq2	mam3p	3731	151945574	EDN63815	100
comp5254_c0_seq3	ygr122w-like protein	1818	151943402	EDN61713	99
comp5406_c0_seq4	atp-binding cassette efflux transporter	1823	254567559	XP_002490890	86
comp5446_c0_seq18	csm2p	1535	151943034	EDN61369	100
comp4048_c1_seq1	syh1p	1273	28564099	AAO32428	89
comp4864_c0_seq2	hca4p	4748	401625093	EJS43118	96
comp4967_c0_seq1	ydr319c-like protein	2263	398366481	NP_010604	100
comp5498_c0_seq1	dad3_yeast	530	21450619	NP_631876	100
comp5498_c0_seq10	arc40p	453	190408616	EDV11881	100



Secuencia	Gen	Longitud pb	gi	UNIPROT	% Similitud
comp5498_c0_seq12	arc40p	6246	6319711	NP_009793	96
comp5498_c0_seq14	arc40p	427	6319711	NP_009793	100
comp5498_c0_seq16	yrb1p	2161	401840268	EJT43156	92
comp5598_c1_seq10	hypothetical protein FOSTERSO_2 162	1848	323308767	EGA62005	96
comp5598_c1_seq12	sgt1p	7144	151945684	EDN63925	99
comp5598_c1_seq14	sgt1p	7512	151945684	EDN63925	99
comp4494_c0_seq2	mch1p	2861	365761613	EHN03254	91
comp5535_c1_seq2	hrt3p	1707	6323126	NP_013198	100
comp3522_c0_seq1	msl5p	2318	190406149	EDV09416	100
comp4233_c0_seq1	sds24p	6331	401838226	EJT41952	85
comp4156_c0_seq2	fzo1p	2634	190408670	EDV11935	100
comp5144_c0_seq4	fcy2p	3265	401626052	EJS44018	97
comp5423_c1_seq9	ptp3p	2617	323337965	EGA79204	100
comp1755_c0_seq2	ylr211c-like protein	1081	9755338	NP_013312	92
comp5423_c1_seq15	ptp3p	4864	259145990	CAY79250	90
comp4087_c0_seq5	nup133p	3484	190409894	EDV13159	99
comp2679_c0_seq1	cue3p	2980	256273202	EEU08149	88
comp5450_c0_seq8	sgs1p	6526	6323843	NP_013914	95
comp5406_c0_seq5	-	0	-	-	-
comp5309_c0_seq5	sec27p	4224	349578093	GAA23259	100
comp5498_c0_seq9	dad3_yeast	499	21450619	NP_631876	100
comp4182_c0_seq2	yor296w-like protein	3506	349581447	GAA26605	94
comp4202_c0_seq2	#NAME?	5656	401841383	EJT43781	95
comp5501_c0_seq5	osh2p	4541	151941974	EDN60330	99
comp4622_c0_seq2	ylr426w-like protein	1054	6323458	NP_013530	87
comp4896_c0_seq4	mvp1p	1855	349580289	GAA25449	91
comp5309_c0_seq7	sec27p	4161	349578093	GAA23259	100
comp7332_c1_seq1	-	0	-	-	-
comp4497_c0_seq1	hsv2p	5450	349578429	GAA23595	99
comp5525_c0_seq6	yhr140w-like protein	5736	401625365	EJS43375	81

**Tabla 14.** Anotación de transcritos diferencialmente expresados para la cepa 820

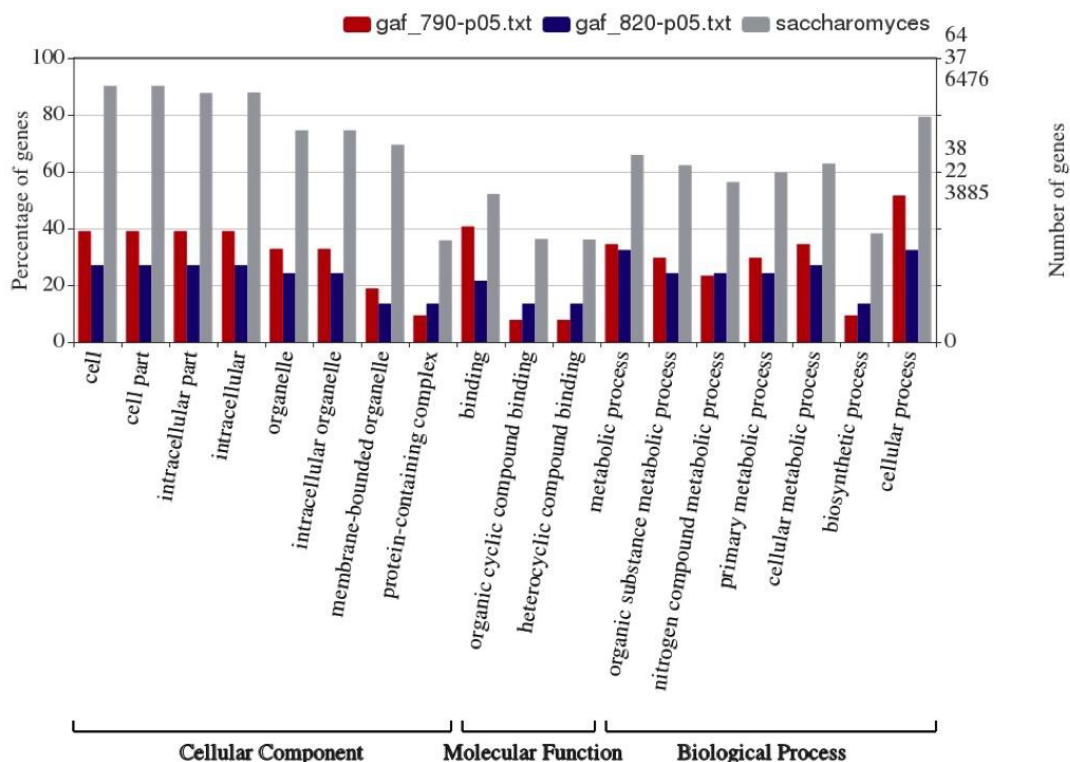
Secuencia	Gen	Longitud pb	gi	UNIPROT	% Similitud
<b>Cepa 820 p=0.001 (19 transcritos)</b>					
comp5744_c0_seq3	bit61p	3064	401625145	EJS43168	88
comp5744_c0_seq2	bit61p	3046	401625145	EJS43168	88
comp5314_c0_seq2	lst8p	6103	401623836	EJS41919	100
comp5672_c0_seq4	ygl146c-like protein	2566	365760793	EHN02485	85
comp5233_c0_seq1	-	5731	401841383	EJT43781	95
comp4711_c0_seq2	nyv1p	3139	190406130	EDV09397	100
comp3320_c0_seq3	shr5p	1706	6324462	NP_014531	100
comp5757_c0_seq6	hip1p	3696	401625564	EJS43564	95
comp5701_c0_seq5	atp4p	2285	6325179	NP_015247	100
comp5422_c0_seq1	yml082w-like protein	2720	6323557	NP_013628	98
comp5701_c0_seq4	rpl21ap	1127	365758047	EHM99912	97
comp2105_c0_seq2	null	0		-	100
comp5619_c1_seq3	60s ribosomal protein l20	795	151945947	EDN64179	100
comp4901_c0_seq1	ydr128w-like protein	7198	323349302	EGA83529	99
comp4585_c0_seq2	(dmc1 rad51 homologue)	2729	6321027	NP_011106	91
comp4585_c0_seq1	(dmc1 rad51 homologue)	2648	6321027	NP_011106	99
comp1788_c0_seq2	bms1p	6530	6325039	NP_015107	99
<b>Cepa 820 p=0.05 (47 transcritos)</b>					
comp4711_c0_seq2	nyv1p	3139	190406130	EDV09397	100
comp4833_c0_seq2	bile pigment transporter	4875	207343239	EDZ70764	95
comp5656_c0_seq3	kap104p	3522	190408812	EDV12077	100
comp4178_c0_seq1	general negative regulator of transcription subunit 1	3305	207347218	EDZ73470	99
comp5090_c0_seq2	rse1p	4036	365763701	EHN05227	89
comp5741_c2_seq22	erv1p	2321	398365231	NP_011543	97
comp5701_c0_seq5	atp4p	2285	6325179	NP_015247	100
comp4847_c0_seq1	argininosuccinate lyase	5487	151943960	EDN62253	99
comp5422_c0_seq1	yml082w-like protein	2720	6323557	NP_013628	98
comp4980_c0_seq1	tna1p	2591	6321698	NP_011776	100
comp5741_c2_seq37	yjl045w-like protein	5047	365764830	EHN06349	100
comp4246_c0_seq1	gdp gtp exchange factor	4317	190409510	EDV12775	99
comp5597_c0_seq3	atg17p	4480	349580116	GAA25277	99
comp5233_c0_seq1	-	5731	401841383	EJT43781	95
comp4585_c0_seq2	(dmc1 rad51 homologue)	2729	6321027	NP_011106	91
comp4801_c0_seq2	partial	2116	365767184	EHN08669	98
comp5619_c1_seq3	60s ribosomal protein l20	795	151945947	EDN64179	100
comp5744_c0_seq3	bit61p	3064	401625145	EJS43168	88
comp5394_c0_seq1	ark1p	2700	6324308	NP_014378	100
comp5314_c0_seq2	lst8p	6103	401623836	EJS41919	100
comp4585_c0_seq1	(dmc1 rad51 homologue)	2648	6321027	NP_011106	99
comp3884_c0_seq2	yhl029c-like protein	1729	323308847	EGA62083	99
comp993_c0_seq2	ygl157w-like protein	1115	226536914	ACO72583	100

Secuencia	Gen	Longitud pb	gi	UNIPROT	% Similitud
comp4490_c0_seq5	slx5p	1443	323309484	EGA62695	100
comp5744_c0_seq2	bit61p	3046	401625145	EJS43168	88
comp3320_c0_seq3	shr5p	1706	6324462	NP_014531	100
comp5672_c0_seq4	ygl146c-like protein	2566	365760793	EHN02485	85
comp5757_c0_seq6	hip1p	3696	401625564	EJS43564	95
comp4711_c0_seq3	nyv1p	3292	190406130	EDV09397	100
comp1788_c0_seq2	bms1p	6530	6325039	NP_015107	99
comp5463_c0_seq3	transcription initiation factor tfiid subunit 2	3263	207347283	EDZ73510	99
comp5701_c0_seq4	rpl21ap	1127	365758047	EHM99912	97
comp5464_c0_seq5	ura2p	7002	190409376	EDV12641	99
comp5686_c0_seq16	rdi1p	1902	365761759	EHN03396	98
comp2105_c0_seq2	ynr063w-like protein	4141	365758590	EHN00425	77
comp3070_c0_seq1	nup157p	2107	259146029	CAY79289	99
comp5275_c0_seq2	urn1	3978	207340251	EDZ68661	99
comp4901_c0_seq1	ydr128w-like protein	7198	323349302	EGA83529	99
comp5551_c0_seq2	hxt3p	3410	207346418	EDZ72919	99
comp5504_c2_seq7	erg27p	1579	207343090	EDZ70657	99
comp5504_c0_seq6	erg27p	1541	323332541	EGA73949	92
comp993_c0_seq1	ygl157w-like protein	1146	226536914	ACO72583	100
comp5540_c1_seq1	tos4p	4257	323332321	EGA73730	99
comp5619_c1_seq4	60s ribosomal protein l20	1166	365758205	EHN00058	98
comp5053_c0_seq2	-	0	-	-	-

### ***B) Agrupacion de genes en base a ontología genética***

Con el objetivo de entender de mejor manera las funciones en las que estan involucrados los genes diferencialmente expresados fue realizado una agrupacion de las secuencias de acuerdo a la anotación por ontología genética para los genes diferencialmente expresados.

Las secuencias fueron clasificadas en base a procesos biológicos, funcion molecular y componente celular en los cuales estan asociados en base a los datos del Gene Ontology Consortium (Octubre 2013), los resultados fueron graficados mediante el software WEGO utilizando como referencia *Saccharomyces sp.* (Fig. 14).



**Figura 14.** Distribución de la clasificación de DEG por GO. En rojo se muestran resultados de la cepa 790, en azul los de la cepa 820 y en gris los correspondientes a la referencia.

En general en la agrupación por ontología genética de las secuencias de ambas cepas no mostro diferencias importantes entre ellas.

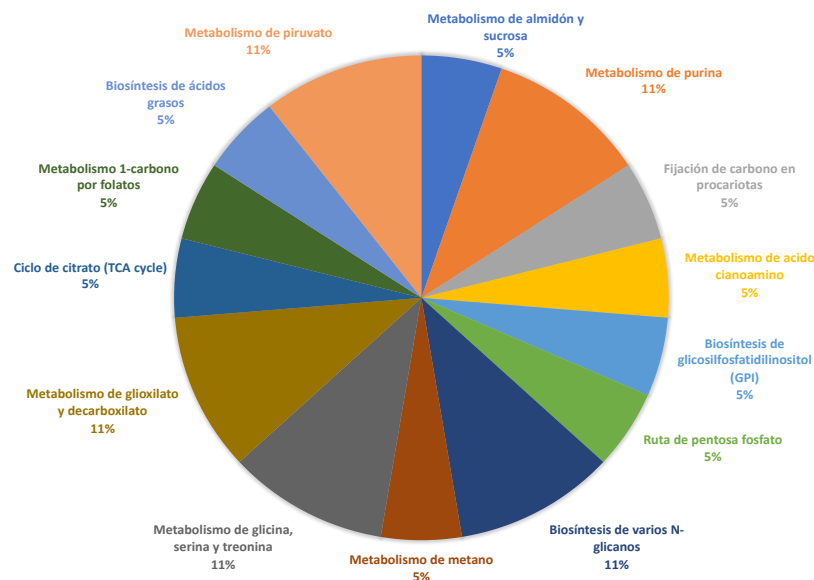
En cuanto a “componentes celulares” las secuencias se agruparon principalmente en los términos de célula y partes celulares. La asociación de “función molecular” describe las actividades del producto del gen a nivel molecular. Las secuencias que se agruparon principalmente en este termino están involucradas en procesos metabólicos y de ligación (interacción de unión entre moléculas). Los “procesos biológicos” describen las operaciones o redes de eventos moleculares que integran los organismos vivos, los mas representados fueron los relacionados a procesos celulares y procesos metabólicos de sustancias orgánicas y de compuestos nitrogenados. Dentro de estos procesos se encuentran aquellos procesos relacionados directamente con la producción de compuestos volátiles importantes para las características organolépticas de la cerveza.

### C) Análisis funcional en base a actividad metabólica

Para el análisis funcional de los genes con expresión diferencial significativa ( $p=0.05$ ) se compararon los datos de la anotación contra la base de datos de rutas metabólicas. Este análisis se realizó con el mismo software Blast2GO a través de la función KEGG orthology. En las siguientes figuras se muestra la distribución del número de secuencias por ruta metabólica y en las tablas se muestran las rutas metabólicas, enzimas identificadas y nombres de las secuencias correspondientes.

Dentro de las rutas metabólicas importantes para el proceso cervecero destacan las relacionadas a metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, ya que están relacionadas directamente a la producción de compuestos volátiles que afectan la calidad de la cerveza (Olaniran *et al.*, 2017).

Las rutas metabólicas mayormente representadas en la cepa 790 fueron las de metabolismo de piruvato, metabolismo de glioxilato, metabolismo de glicina, serina y treonina, metabolismo de purina y biosíntesis de N-glicanos (Fig. 15).



**Figura 15.** Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial  $p=0.05$  cepa 790

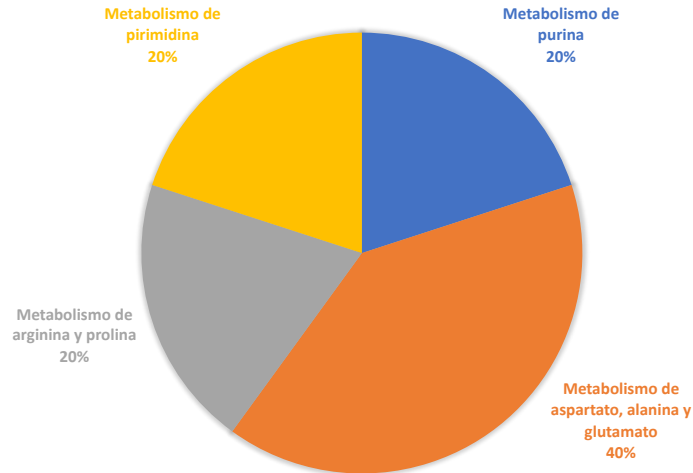
Dentro de las enzimas mas importantes identificadas en estas rutas metabolicas se destacan (Tabla 15):

- Piruvato carboxilasa, esta enzima involucrada en las rutas metabolicas del piruvato, ciclo del citrato y biosintesis de acidos grasos, cataliza la carboxilacion del piruvato para generar oxaloacetato en presencia de ATP. Inhibida por aspartato (Jitrapakdee *et al.*, 2007).
- La presencia de las enzimas glicina deshidrogenasa y glicina hidroximetiltransferasa sugieren que la ruta del metabolismo de glicina, serina y treonina está siendo dirigida a la síntesis de serina a partir de la presencia de glicina en el medio (Salcedo *et al.*, 2005).
- Otra de las enzimas con expresión diferencial encontrada fue la metilglioalasa. Esta enzima está involucrada en la detoxificación de metilglioal, el cual, ha sido asociado junto con ciertos amino ácidos a la formación de compuestos volátiles que afectan el aroma de la cerveza (Agudelo-Romero *et al.*, 2013; Pripis-Nicolau *et al.*, 2000).

**Tabla 15.** Enzimas identificadas con expresión diferencial p=0.05 cepa 790

Ruta Metabólica	Enzima	Secuencias
Metabolismo de almidón y sucrosa	Glicogen sintasa (ec:2.4.1.11). Gen GSY	comp5006_c0_seq3
Metabolismo de purina	Adenosin trifosfatasa (ec:3.6.1.3) Gen MAM3	comp5386_c0_seq2
Metabolismo de purina	Ribosa-fosfato difosfoquinasa (ec:2.7.6.1). Gen PRS	comp5386_c0_seq2
Fijación de carbono en procariotas	Piruvato carboxilasa (ec:6.4.1.1). Gen PYC2	comp5588_c0_seq3
Metabolismo de acido cianoamino	Glicina hidroximetiltransferasa (ec:2.1.2.1). Gen SHM1	comp5205_c0_seq1
Biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI)	N-acetilglucosaminil transferasa (ec:2.4.1.198). Gen SPT14	comp4909_c0_seq1
Ruta de pentosa fosfato	Difosfoquinasa (ec:2.7.6.1). Gen PRS	comp5386_c0_seq2
Biosíntesis de varios N-glicanos	$\beta$ -manosiltransferasa (ec:2.4.1.142). Gen ALG1	comp3822_c0_seq1
Metabolismo de metano	Glicina hidroximetiltransferasa (ec:2.1.2.1). Gen SHM1	comp5205_c0_seq1
Metabolismo de glicina, serina y treonina	Glicina deshidrogenasa (decarboxil) (ec:1.4.4.2). Gen GCV1	comp5450_c0_seq8
Metabolismo de glicina, serina y treonina	Glicina hidroximetiltransferasa (ec:2.1.2.1). Gen SHM1	comp5205_c0_seq1
Metabolismo de glioxilato y decarboxilato	Isocitrate lyase (ec:4.1.3.1). Gen ICL2	comp5207_c0_seq2
Ciclo de citrato (Ciclo de ATC)	Piruvato carboxilasa (ec:6.4.1.1). Gen PYC2	comp5588_c0_seq3
Biosíntesis de N-glicano	$\beta$ -manosiltransferasa (ec:2.4.1.142). Gen ALG1	comp3822_c0_seq1
Metabolismo 1-carbono por folatos	Hidroximetiltransferasa (ec:2.1.2.1). Gen SHM1	comp5205_c0_seq1
Metabolismo de piruvato	Piruvato carboxilasa (ec:6.4.1.1). Gen PYC2	comp5588_c0_seq3
Metabolismo de piruvato	Metilglioalasa (Sulfur-Carbon Liasa) (ec:4.4.1.5). Gen GLO1	comp4496_c0_seq2

Las rutas metabólicas mayormente representadas en la cepa 820 fueron las de metabolismo aspartato, alanina y glutamato, metabolismo de pirimidina, metabolismo de purina, metabolismo de arginina y prolina (Fig. 16).



**Figura 16.** Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial  $p=0.05$  cepa 820

Dentro de estas rutas metabólicas fueron detectadas tres diferentes enzimas (Tabla 16):

- La enzima argininosuccinato liasa es requerida para la biosíntesis de arginina, cataliza el rompimiento reversible del argininosuccinato a arginina y fumarato (Trevisson *et al.*, 2009).
- La enzima Aspartato carbamoiltransferasa cataliza la reacción de aspartato a N-carbamoil-L-aspartato en las rutas metabólicas de la Pirimidina. Esta ruta es importante para la fermentación debido a que se relaciona con la resistencia a etanol y la proliferación celular en *Saccharomyces cerevisiae* (Pais *et al.*, 2013).
- La enzima ATPasa cataliza la hidrólisis de ATP a ADP y fosfato. Esta enzima también actúa como un transportador de electrones (Kanehisa *et al.*, 2000). El análisis de la secuencia nucleotídica del transcrito, mostró una alta identidad (94%) con el gen BPT1 el cual fue asociado a genes de



adaptación a las condiciones de estrés anaeróbico durante la fermentación (Gibson *et al.*, 2007).

**Tabla 16.** Rutas metabólicas presentes en secuencias con expresión diferencial  $p=0.05$  cepa 820

Ruta metabólica	Enzima	Secuencia
Metabolismo de purina	ATPasa (ec:3.6.1.3)	comp4833_c0_seq2
Metabolismo de aspartato, alanina y glutamato	Aspartato carbamoiltransferasa (ec:2.1.3.2). Gen PYR2	comp5464_c0_seq5
Metabolismo de aspartato, alanina y glutamato	Argininosuccinato liasa (ec:4.3.2.1). Gen ARG4	comp4847_c0_seq1
Metabolismo de arginina y prolina	Argininosuccinato liasa (ec:4.3.2.1). Gen ARG4	comp4847_c0_seq1
Metabolismo de pirimidina	Aspartato carbamoiltransferasa (ec:2.1.3.2). Gen PYR2	comp5464_c0_seq5

#### ***D) Análisis de redes de asociación de proteína a proteína***

Para un mayor entendimiento de sobre el efecto de los genes que encontramos diferencialmente expresados (DGEs) en ambas cepas sobre la generación de ésteres y compuestos de azufre fue realizado un análisis de asociación de redes entre proteínas. Para este análisis fue utilizada la base de datos de String (Szklarczyk *et al.*, 2017) con los genes DGEs y los genes que fueron estudiados por Leal-Guerra (2011) (compuestos de azufre) y Quintero-Vásquez (2011) (ésteres) quienes demostraron que estos genes tenían un efecto sobre las rutas de producción de tales compuestos (Tabla 17). Los análisis se dividieron por cepa y por compuesto de interés.

### **III.3.6 Asociación de genes diferencialmente expresados con la generación de compuestos volátiles de azufre y esterres**

#### ***A) Asociación de DGEs con la generación de compuestos de azufre***

El control de la generación de compuestos volátiles de azufre es una prioridad en la industria cervecera. La presencia de estos compuestos, en ordenes de ppb, aportan sabores y olores desagradable afectando la calidad sensorial de la cerveza. Estos compuestos son el resultado del metabolismo de los aminoácidos



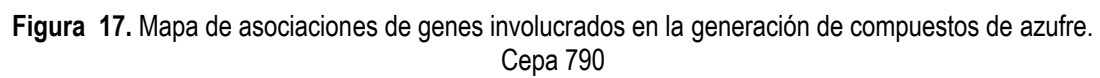
presentes en el mosto para la síntesis de proteínas en la levadura. Leal-Guerra (2011) estudió los genes involucrados en la generación de estos compuestos y demostró que su expresión varía dependiendo de la cepa utilizada y de los componentes del mosto, específicamente de las concentraciones de aminoácidos presentes.

**Tabla 17.** Genes involucrados en la generación de compuestos aromáticos

Genes involucrados en la generación de compuestos de azufre				
SUL1	MET10	SAM1	MET31	HOM3
SUL2	MET25	SAM2	MET32	HOM2
MET3	STR1	MHT1	SER33	HOM6
MET14	STR4	SAH1	SER1	THR4
MET16	MET2	MET4	SER2	GCN4
MET5	MET6	CBF1	CYS4	
MET13	MET28	THR1	CYS3	
Genes involucrados en la generación de ésteres				
PDC1	ADH2	ILV5	BAT1	PDB1
PDC6	ADH3	ILV3	BAT2	PDA1
ADH4	ATF1	LEU4	ARO10	LPD1
ADH5	ATF2	LEU9	THI3	LAT1
SFA1	ILV2	LEU1	LEU3	
ADH1	ILV6	LEU2	PMA1	

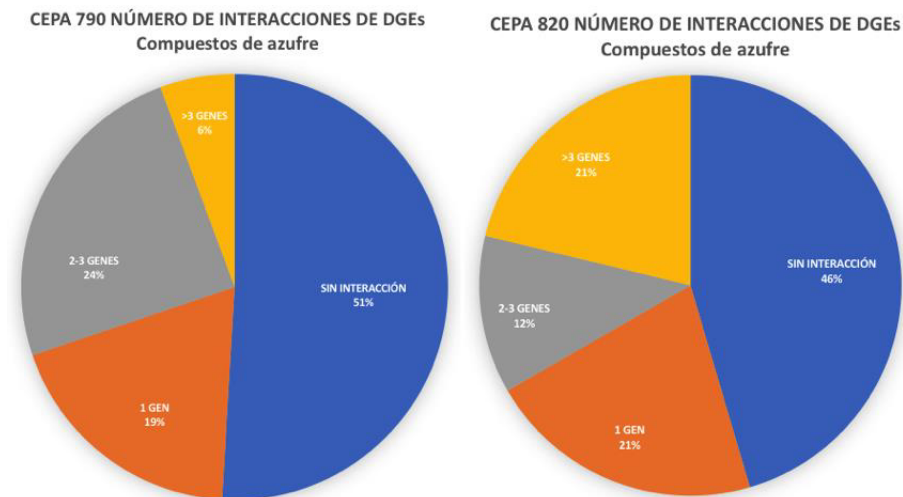
En este trabajo, buscamos la asociación de genes involucrados en la generación de compuestos volátiles de azufre con un análisis de expresión diferencial en cuanto a variedad de malta utilizada para complementar el estudio de la producción de tales compuestos.

En las figuras 17 y 18, se muestra el mapa de asociaciones obtenidas mediante el análisis en la base de datos de String para cada cepa.





Interesantemente, la cepa 790 muestra un 6% de DGEs que se asocian con más de 3 genes o DGEs, mientras que en la cepa 820 un 21%.



**Figura 19.** Numero de interacciones entre DGEs y genes en las rutas de generación de compuestos de azufre

En la tabla 18 se presentan los DGEs con su nivel de asociación indicado con color (mismo que anteriores). Los DGEs marcados en rojo tienen asociaciones directas con genes en las rutas de generación de compuestos de azufre, los cuales para nuestro estudio son los más importantes.

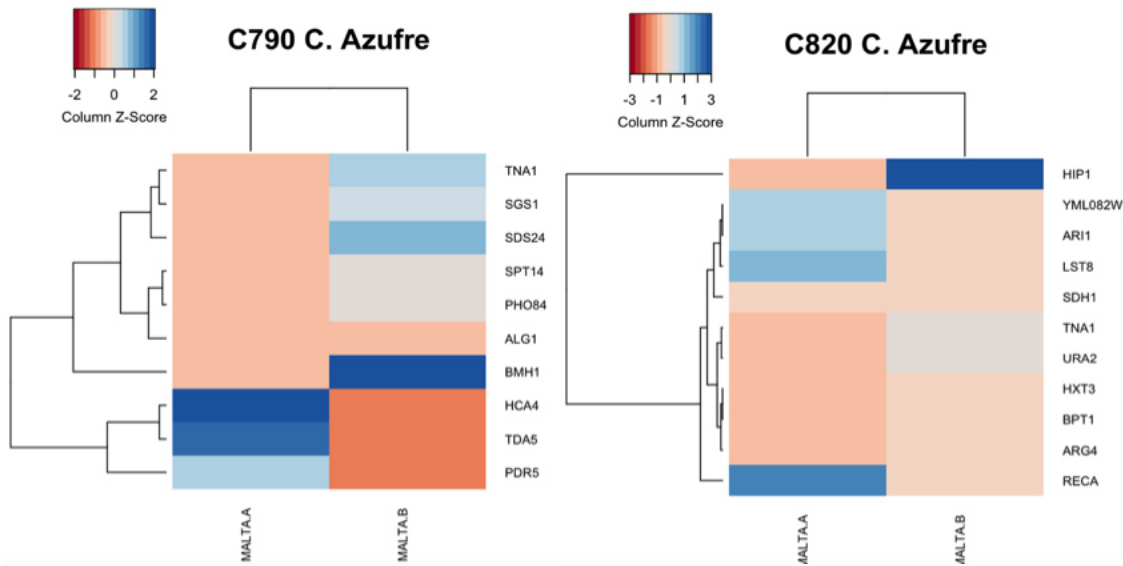
Se puede observar claramente que la cepa 790 tiene mayor expresión de genes asociados a la generación de compuestos de azufre en mosto con malta M2 que con malta M1 (genes en azul indican mayor expresión).

La cepa 820 por el contrario, muestra una mayor expresión de genes asociados a compuestos de azufre al utilizar la malta M1.

La cepa 790 tiene 10 DGEs con asociación directa a la ruta de generación de compuestos de azufre y la cepa 820 tiene 11 DGEs (Figura 20)

**Tabla 18.** Asociación de DEGs con genes involucrados en generación de compuestos de azufre

CEPA 790									
BOI1		MED1		YHR140W		YRB1		STO1	
CUE3		NPR3		YKL187C		ICE2		TNA1	
DAD3		PDS1		YLR211C		PR40S S24		SPT14	
ELP4		PIG2		YOR296W		ENP2		ALG1	
FCY2		PTP3		YPL066W		BMH1		ARC40	
FZO1		PYC2		HRT3		CSM2		ARF2	
GYP1		SGT1		NUP133		HCA4		SHM1	
HSV2		TRM12		PDR5		MMS2		SDS24	
ICL2		OSH2		PHO84		MVP1		SGS1	
MAM3		YDR319C		SYH1		RPL21A			
MCH1		YGR122W		TDA5		SEC27			
CEPA 820									
NYV1		ERV1		KAP104		TNA1			
ARK1		RDI1		NUP157		ARG4			
ATG17		SHR5		RSE1		ARI1			
ATP4		SLX5		TAF2		HIP1			
BMS1		YDR128W		URN1		RECA			
ERG27		YNR063W		BPT1		SDH1			
YGL146C		BIT61		LST8		URA2			
YHL029C		HXT3		RPL21A		YML082W			



**Figura 20.** Niveles de expresión de DGEs respecto a variedad de malta asociados a rutas de generación de compuestos de azufre. Malta A y B corresponde a M1 y M2.

### ***B) Asociación de DGEs con la generación de ésteres***

Los ésteres son otro tipo de compuestos volátiles que definen las características de la cerveza. Por el contrario, a los compuestos de azufre, la presencia de algunos ésteres es deseable en algunos tipos de cerveza. Estos compuestos aportan sabores y olores “afrutados” agradables que definen el estilo de muchas cervezas, generalmente del tipo lager y su generación es el resultado del metabolismo de ácidos orgánicos (Verstrepen *et al.*, 2003). Quintero-Vásquez (2011), estudio la expresión de genes en varias rutas metabólicas involucradas en la generación de estos compuestos encontrando que la producción de esterres esta más relacionada a la interacción cepa-temperatura que a la composición del mosto.

En las figuras 21 y 22, se muestra el mapa de asociaciones obtenidas mediante el análisis en la base de datos de String para cada cepa.

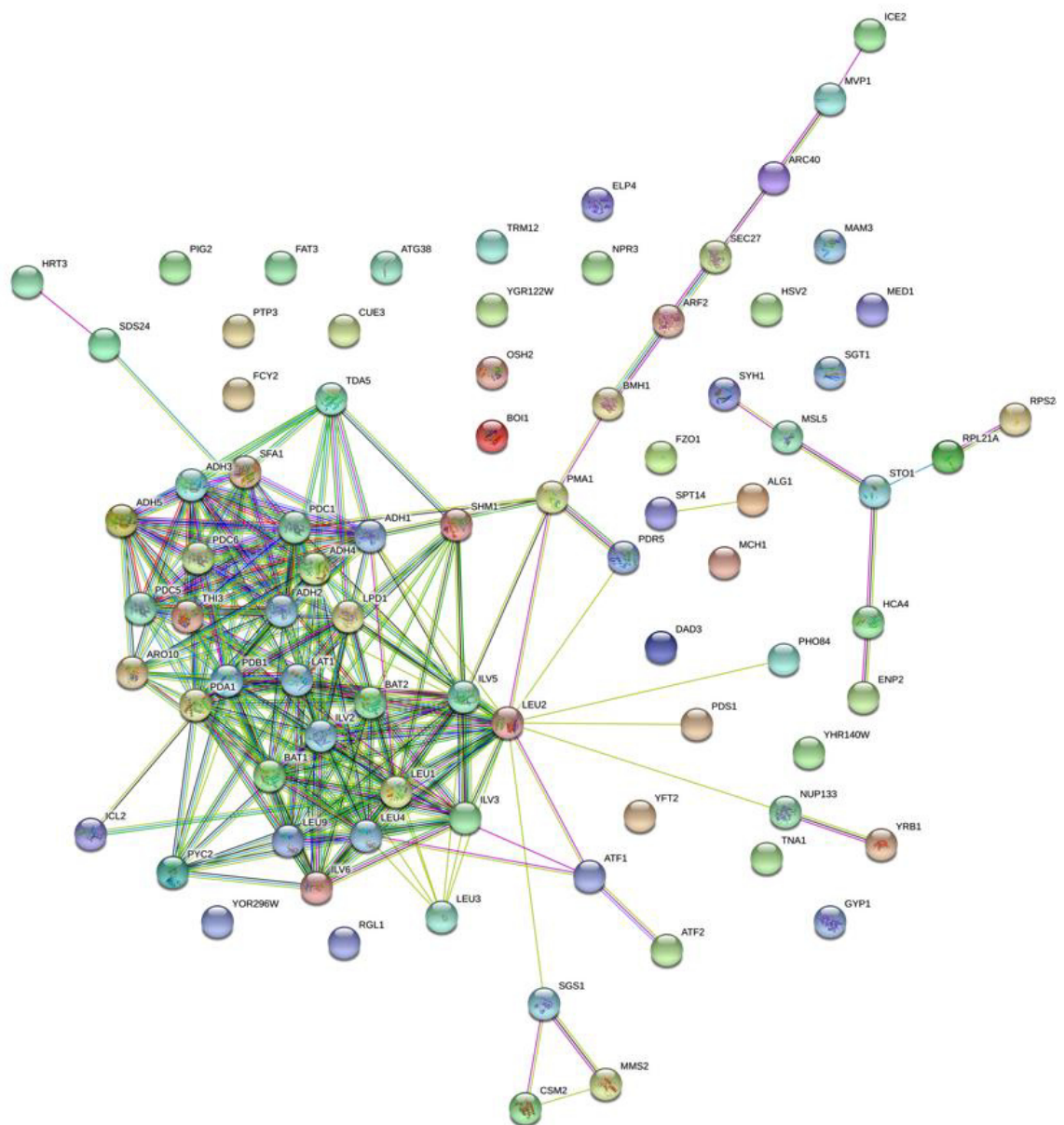
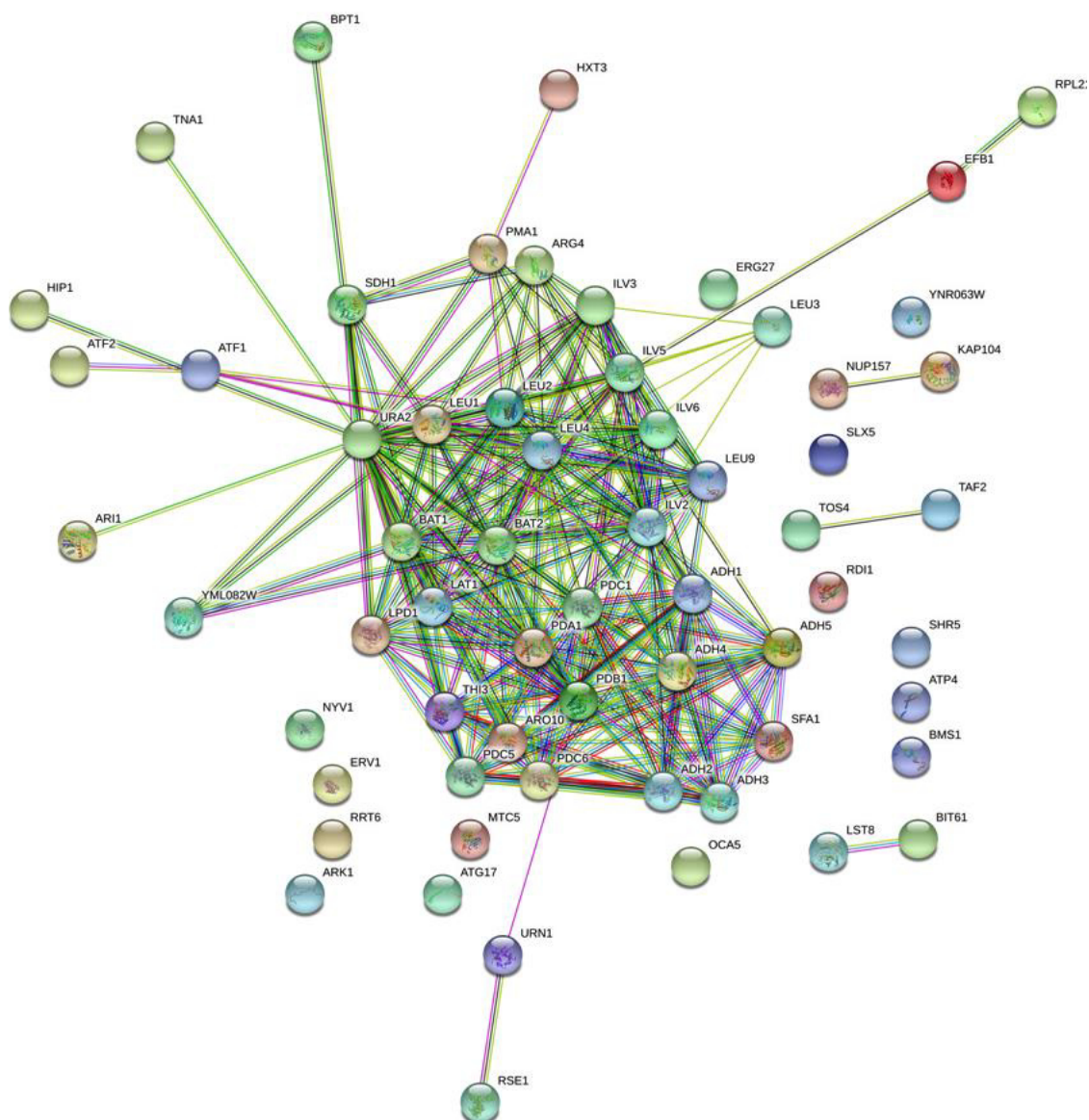


Figura 21. Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de esteres. Cepa 790

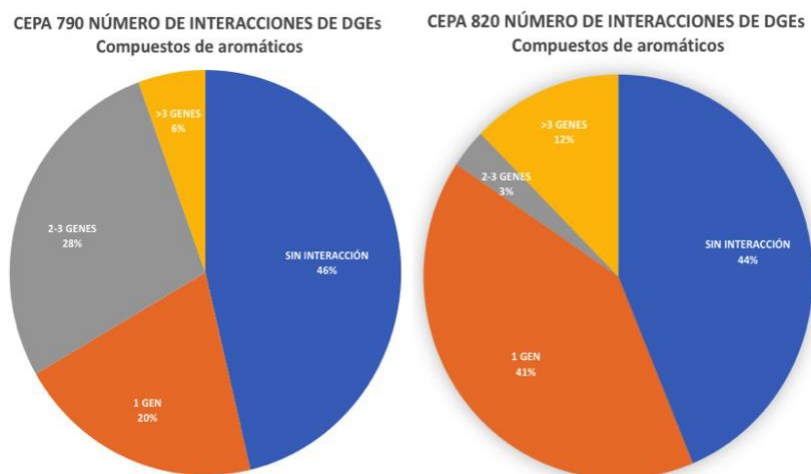




**Figura 22.** Mapa de asociaciones de genes involucrados en la generación de ésteres. Cepa 820

El análisis de asociación de genes muestra que el 45% de los DGEs no presentan interacciones entre otros DGEs ni con genes involucrados en la producción de ésteres. La cepa 790 presenta un 20% de DGEs que tienen interacción con solo 1 gen mientras que la cepa 820 un 40%. En cuanto a la interacción con 2 o 3 genes o DGEs, la cepa 790 muestra 28% y la cepa 820 solo un 3%. Para un número de asociaciones mayor a 3 genes o DGEs, la cepa 790 muestra un 6% mientras que la cepa 820 un 17% (Fig. 23).





**Figura 23.** Numero de interacciones entre DGEs y genes en las rutas de

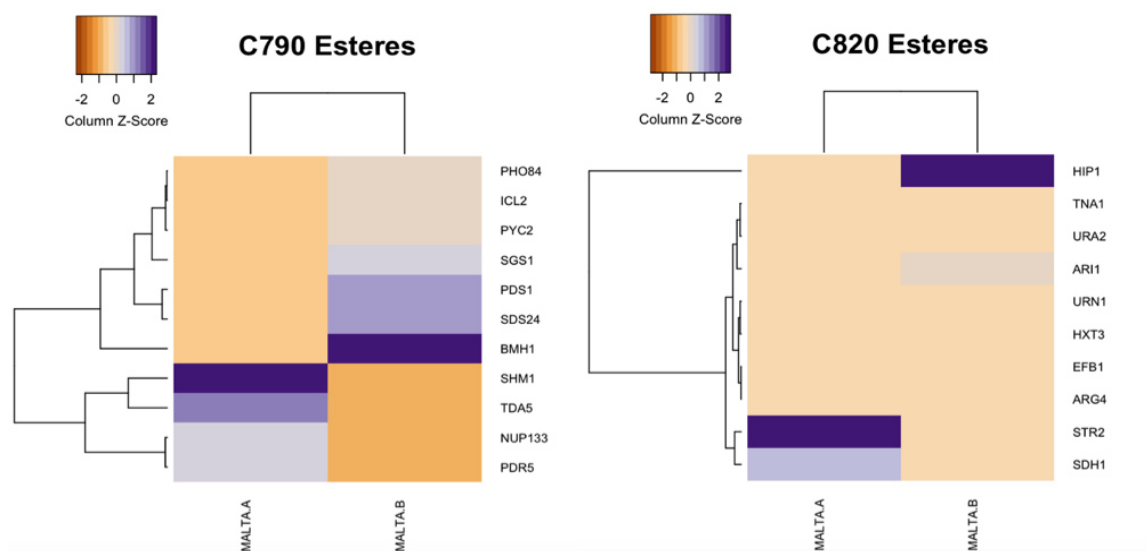
En la tabla 19 se presenta la identidad de los DGEs con su nivel de asociación indicado por color (mismo que anteriores).

**Tabla 19.** Asociación de DEGs con genes involucrados en generación de compuestos volátiles

CEPA 790									
BOI1		MED1		ATG38		SPT14		MVP1	
CUE3		OSH2		YOR296W		SYH1		NUP133	
DAD3		PTP3		RGL1		YRB1		RPL21A	
ELP4		RMD11/NPR3		RPS24A		ARC40		SDS24	
FCY2		SGT1		ALG1		ARF2		SEC27	
FZO1		TNA1		BMH1		PDR5		SGS1	
PIG2		TRM12		ENP2		CSM2		STO1	
GYP1		YFT2		HRT3		HCA4		PYC2	
HSV2		YGR122W		ICE2		ICL2		SHM1	
MAM3		YHR140W		PDS1		MMS2		TDA5	
MCH1		FAT3		PHO84		MSL5			
CEPA 820									
NYV1		SHR5		BPT1		HIP1		ARG4	
ERV1		RRT6		KAP104		RPL21A		STR2	
ATP4		BMS1		RSE1		NUP157		SDH1	
ATG17		RDI1		TNA1		URN1		URA2	
ARK1		YNR063W		BIT61		HXT3			
OCA5		MTC5		LST8		TOS4			
SLX5		ERG27		ARI1		EFB1			

Los DGEs marcados en rojo tienen asociaciones directas con genes en las rutas de generación ésteres, los cuales para nuestro estudio son los más importantes.

Los niveles de expresión, respecto a la variedad de malta, de los DGEs con asociación directa a genes relacionados con la producción de ésteres se presentan en la figura 24, donde se observa que la cepa 790 tiene una mayor expresión en mosto con malta M2. La cepa 820 muestra poco o nada de cambio en la expresión de los DGEs.



**Figura 24.** Niveles de expresión de DGEs respecto a variedad de malta asociados a rutas de generación de ésteres. Malta A y B corresponde a M1 y M2.

### III.3.7 Análisis de la función de genes diferencialmente expresados y su relación con la generación de compuestos volátiles de azufre y esterres

Los resultados de cada cepa fueron analizados de manera funcional para tratar de interpretar como los DEGs y sus genes asociados interactúan para la producción de compuestos aromáticos en la fermentación. De esta manera se pretende dar una explicación a los resultados analíticos obtenidos de las

fermentaciones de los mostos y asociar cada gen o grupo de genes expresados con las características de la malta utilizada en la preparación del mosto.

### ***A) Formación de compuestos de azufre. Cepa 790***

Los DGEs que fueron asociados con genes de la ruta de generación de compuestos de azufre fueron los siguientes:

- **SPT14**

Expresado en Mosto 2.

Este gen es el mediador del primer paso en la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Mutaciones en este gen crea defectos en la transcripción y biogénesis de las proteínas que forman la pared celular (Cherry *et al.*, 2012). El análisis de asociación de genes mostro que interactua con los genes ALG1 y SUL1.

Este gen ha sido relacionado a floculinas, las cuales están ancladas por GPI a la pared celular (Pittet y Conzelmann. 2007). Las proteínas GPI también han sido relacionadas a la formación y estabilidad de la espuma en vinos (Blasco *et al.*, 2011).

- **ALG1**

Expresión fue similar en ambos mostos.

Este gen codifica para manosiltransferasas las cuales están ancladas a la pared celular mediante proteínas GPI, formando la pared celular (Cherry *et al.*, 2012). Se ha relacionada la sobreexpresión de estos dos tipos de proteínas con un mejor desempeño en la fermentación y desempeñan un rol importante en la adaptación a bajas temperaturas (López-Malo *et al.*, 2015). El análisis de asociación de genes mostro este gen que interactua con los genes SPT14 y MET5.

Los genes ALG1 y SPT14 estan relacionados con el gen SUL1 el cual codifica para la enzima sulfato permeasa de alta afinidad que regula la entrada

de sulfato extracelular a la célula y el gen **MET5**, codifica para la enzima sulfito reductasa, reprimida por la presencia de metionina. (Cherry *et al.*, 2012)

- **TNA1**

Expresado en Mosto 2.

Codifica para una permeasa de nicotinato y es responsable de su absorción. Su expresión está relacionada con la disminución o ausencia de nicotinato en la célula (Cherry *et al.*, 2012). El nicotinato es requerido para la síntesis de NAD<sup>+</sup> y la levadura puede sintetizarlo mediante el metabolismo del triptófano (Ishtar y Yde. 2006).

El análisis de asociación de genes mostro que interactúa con los genes **MET5** (sulfito reductasa) y **CYS4** (cistationina beta-sintasa). Enzimas claves en la ruta de asimilación de sulfatos (Herrera-Gamboa *et al.*, 2015)

Mediante el análisis a las rutas metabólicas (Tabla 15) encontramos enzimas glicina hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.1, gen **SHM1**) y glicina deshidrogenasa (EC 1.4.4.2, gen **SGS1**). Estas enzimas dirigen la ruta de biosíntesis de glicina, serina y treonina para la síntesis de serina o glicina (Kanehisa *et al.*, 2000). Haciendo un análisis de la relación entre los genes encontrados y los resultados analíticos obtenidos de los mostos y cervezas, se propone la siguiente explicación representada en la figura 25.

En fermentaciones con mosto producido con malta M1, encontramos una disminución de metionina, pero alta concentración de aspartato y serina. En este mosto, la cepa 790 utiliza la ruta de asimilación de sulfatos (flechas rosas), permitiendo la entrada de sulfato extracelular mediante la acción del gen **SUL1**. El sulfato es reducido hasta sulfuro por la acción de **MET5**. Como los aminoácidos serina y aspartato estaban presentes en este mosto, suficientes precursores de homocisteína estuvieron presentes para la síntesis de metionina, ya sea por la acción del gen **CYS4** y serina, o por el metabolismo de aspartato (Mountain *et al.*, 1991). Otra opción es que la serina puede estar siendo dirigida hacia la síntesis de glicina mediante el gen **SHM1** y **SGS1**.



## ***B) Formación de compuestos de azufre. Cepa 820***

Los DGEs que fueron asociados con genes de la ruta de generación de compuestos de azufre fueron los siguientes:

- **TNA1**

Expresado en Mosto 2.

La función de este gen ya ha sido explicado para la cepa 790. Está asociado a los genes MET5, CYS4 Y URA2. De los anteriores, el producto del gen URA2, una enzima aspartato carbomoiitransferase (EC 2.1.3.2) fue detectada mediante el análisis de rutas metabólicas.

- **YML082W/STR2**

Expresado en Mosto 1.

Este gen codifica una probable proteína con actividad liasa carbono-azufre, es regulada por UPC2 (elementos regulatorios de biosíntesis de esterol). Se conoce un gen parálogo, STR2 que codifica para una cistationina gamma-sintasa, la cual convierte la cisteina en cistationina y es clave durante la síntesis de metionina (Cherry *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013). Genes que codifican para este tipo de enzimas, se han relacionado con un incremento en las concentraciones de tioles volátiles en vinos (Howell *et al.*, 2005). Este tipo de enzimas convierten el ion sulfuro ( $\text{HS}^-$ ) en  $\text{H}_2\text{S}$ , el cual incrementa la formación de tioles (Tominaga *et al.*, 2000).

Este gen está fuertemente asociado a genes implicados en la ruta de asimilación de sulfatos: SAH1, MET2, MET6, CYS3, CYS4, THR1, SER1, SAM2, HOM2, MET13 y URA2.

- **HIP1**

Expresado en Mosto 2.

Codifica para la enzima permeasa de histidina que se encarga del transporte del aminoácido histidina y transporte de iones magnesio. Fue asociado

con el gen URA2 para la síntesis de pirimidina a partir de las rutas de metabolismo de histidina y aspartato. Altas concentraciones del aminoácido histidina han sido relacionadas a un aumento de compuestos de azufre durante la fermentación (Eschenbruch. 1974).

- **LST8**

Expresado en Mosto 1.

Codifica para una proteína de transporte de la permeasa de aminoácidos GAP1, la cual detecta la disponibilidad de sustratos de aminoácidos para regular la localización en la membrana plasmática cuando sea necesario. LST8 es parte de la ruta de TOR (serina-treonina quinasas en base a su disponibilidad) (Cherry *et al.*, 2012).

Este gen tiene asociación con BIT61 (ruta de TOR) que participa en la regulación del ciclo celular y con MET28 el cual activa la transcripción del complejo MET4-CBF1-MET28 involucrados en el metabolismo de aminoácidos azufrados. (Cherry *et al.*, 2012)

La activación de estos genes y la ruta de TOR sugiere que la viabilidad de las células esta disminuyendo (Duc *et al.*, 2017).

- **ARI1**

Expresado en malta M1.

Reductasa de aldehídos aromáticos y alifáticos. Esta enzima fue reportada por primera vez por Liu y Moon (2009) y diversos experimentos mostraron que es capaz de reducir un gran numero de aldehídos a su respectivo alcohol. Entre los alcoholes aromaticos producidos por esta enzima se encuentra el 2-feniletanol, interesantemente este compuesto se relaciona con la respuesta de tipo “quoroum sensing” reportada en levaduras (Avbelj *et al.*, 2016) la cual modera el comportamiento de las células hacia diferentes procesos (como son la floculación y generación de esporas) en respuesta a las condiciones del medio.

Asociación con URA2

- **RecA/DMC1**

Expresado en Mosto 1.

Homólogo del gen RAD51. Estos genes codifican para la enzima recombinasa específica de meiosis requerida para la reparación del rompimiento de DNA de doble hélice y el emparejamiento de cromosomas homólogos (Shinohara et al., 2003). La presencia de este gen ha sido altamente relacionada con el proceso de meiosis debido a su alta especificidad (Khan y Siddiqui 2015).

Por otra parte, la escasez de compuestos de azufre en la célula puede iniciar el proceso de meiosis y esporulación a través de la disminución de S-adenosilmetionina y otros nucleósidos trifosfatados. Cuando hay suficiente sulfato, las células pueden producir y almacenar suficientes precursores para su crecimiento soportando por varias horas esta limitación (Freese *et al.*, 1984).

El gen DMC1 fue asociado a los genes HOM3, URA2, CYS4, ARG4, SAM1, MET17, SAM2, MET10 y RPL21A.

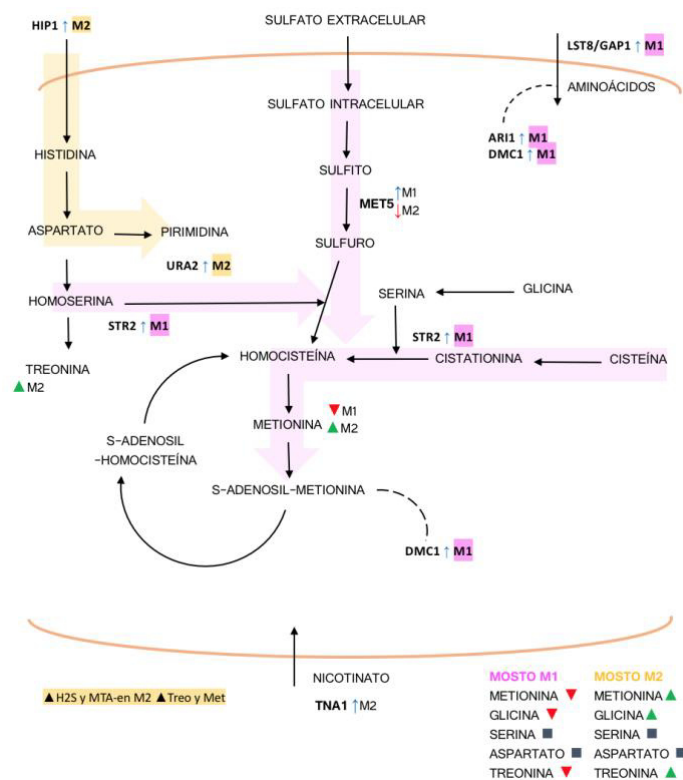
La figura 26 muestra los resultados del análisis sobre la función de estos genes y su relación con las concentraciones de aminoácidos presentes en el mosto en la producción de compuestos de azufre.

En el mosto M1, la cepa 820 produce una menor cantidad de compuestos de azufre en comparación con el mosto M2.

La cepa 820 sobreexpresa el gen **STR2** para la producción de metionina evitando la acumulación de sulfuro, ya sea por la vía de la cisteína o de la treonina (que estuvo presente en alta concentración en este mosto). Para compensar la baja concentración de aminoácidos presentes en el mosto, la cepa 820 sobreexpresa el gen **LST8** que se encarga de transportar a las permesas de aminoácidos (**GAP1**) para poder absorber una mayor cantidad de estos.

Esta cepa mostró un crecimiento 7 veces mayor que la cepa 790, este crecimiento excesivo podría estar agotando rápidamente los nutrientes disponibles en el mosto, lo cual se ve reflejado en la sobreexpresión de los genes **ARI1** y **DMC1** en respuesta a la baja concentración de compuestos nitrogenados.





**Figura 26.** Formación de compuestos de azufre. Cepa 820 (Modificado de Leal, 2011)

En el mosto M2, sobreexpresa el gen **HIP1** para aumentar la entrada de histidina a la célula y junto con el aspartato, dirigir la ruta hacia la síntesis de pirimidinas. Al reducir la disponibilidad del aspartato para la síntesis de homoserina y no tener suficiente serina en el medio, la síntesis de homocisteína se reduce, acumulándose el sulfuro en la célula y dejando libre la metionina para la generación de metiltiosulfato.

La ruta de las pirimidina puede estar siendo favorecida por la cepa 820 debido a un incremento en la concentración de etanol en el medio, como producto del aumento en la densidad celular de esta cepa durante la fermentación.

La cepa 820 también sobreexpresa el gen **TNA1** pero en niveles mas bajos que la cepa 790 y con una expresión similar en ambas maltas, además con la presencia de metionina en el medio no hay mas evidencia para pensar que el nicotinato este siendo utilizado para la síntesis de homocisteína como en el caso de la 790.

### ***C) Formación de esteres. Cepa 790***

Los DGEs que fueron asociados con genes de la ruta de generación de esteres fueron los siguientes:

- **ICL2**

Expresado en M2

El gen ICL2 codifica para la enzima 2-metilisocitrato liasa de mitocondria. Participa en el ciclo del metilcitrato catalizando la conversión de 2-metilisocitrato a succinato y piruvato. Su transcripción es reprimida por el etanol (Cherry *et al.*, 2012) y potenciada por treonina (Luttik *et al.*, 2000). Este gen mostro asociaciones con los genes LEU1 (Isopropilmalato isomerasa que participa en la síntesis de leucina) y PDA1 (Subunidad de la piruvato deshidrogenasa para la producción de acetil-CoA a partir de piruvato) (Cherry *et al.*, 2012).

- **PYC2**

Expresado en M2

Codifica para piruvato carboxilasa. Se encarga de convertir el piruvato en oxaloacetate (Cherry *et al.*, 2012; Pronk *et al.*, 1996), importante precursor en diversas rutas como lo son el ciclo de TCA, ciclo de glioxilato, síntesis de aminoácidos, síntesis de purina, ácidos grasos y proteínas (Huet *et al.*, 2003). Experimentos a nivel transcripcional indican que los aminoácidos glutamato, asparagina y glutamina tienen un efecto represor en la transcripción de este gen (Huet *et al.*, 2003). Debido a la importancia del piruvato en rutas de síntesis de esteres, el gen PYC2 mostró asociaciones con genes importantes como son: PDA1, PDB1, PCD1, LAT1, BAT1, LEU1, LEU9, LEU4 e ILV6. Todos estos genes están involucrados en la ruta de síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo (Quintero-Vásquez. 2011).

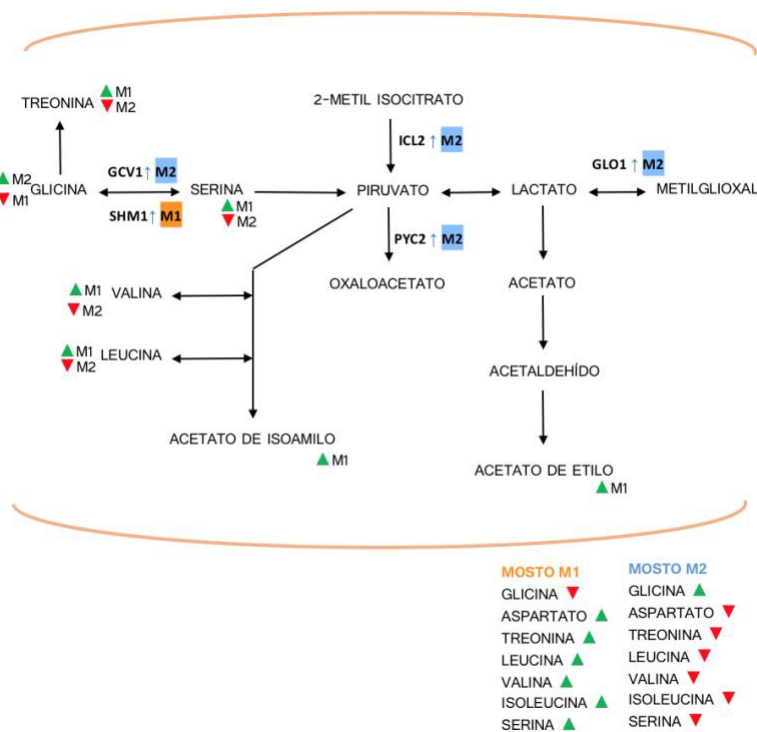


Figura 27. Formación de ésteres. Cepa 790

- **SHM1**

Expresado en M1

Codifica para una hidroximetil transferasa de serina mitocondrial., Se encarga de la conversión de serina a glicina y 5,10-metilenetetrahidrofolato, el cual esta involucrado en generar precursores para la síntesis de purina, pirimidina, aminoácidos y lípidos (Cherry *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2017). Variaciones en su expresión son similares a las variaciones en la concentración de serina (Yin et al., 2017). Este gen mostro asociación con los siguientes genes: BAT1, BAT2, LEU1, ILV5 (involucrados en la generación de acetato de isoamilo); ADH1 (producción de acetato de etilo); LPD1 y LAT1 (participan en la conversión de piruvato a acetil CoA) y PMA1 (bomba de protones de la membrana plasmática).

El análisis de los DGEs mediante la asociación con los genes involucrados en la generación de ésteres y el análisis en las rutas metabólicas nos proporciona información importante para explicar la formación de ésteres (Fig. 27).

La formación de ésteres de acetato (acetato de etilo e isoamilo) requiere de dos componentes principales: el acetil-CoA, generado mediante la descarboxilación oxidativa del piruvato y un alcohol superior que es producido en el metabolismo de aminoácidos (Loviso y Libkind. 2018).

En el mosto M1, la levadura tiene suficientes niveles de aminoácidos, en comparación con el mosto M2. La treonina fue el aminoácido con mayor concentración en relación a los otros, por lo que podría estar siendo metabolizado para la síntesis de serina, aminoácido clave para la producción de piruvato, a través de la síntesis de glicina y el gen **SHM1**. Al existir suficiente piruvato y los aminoácidos valina y leucina, hay un aumento en la producción de acetatos y acetaldehído para la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo.

En el mosto M2, se encontró expresada la vía alterna de producción de serina a partir de glicina mediante la expresión del gen **GCV1** (Tabla 15). Cuando la cantidad de serina es insuficiente para la producción de piruvato este puede ser generado a partir de otras rutas. En este mosto se encontró expresado el gen **ICL2** el cual cataliza la producción de piruvato a partir del 2-metilisocitrato y el gen **GLO1** el cual cataliza la producción de lactato a partir del metilglioal., Cuando suficiente piruvato es producido para satisfacer el metabolismo, el lactato es dirigido hacia la producción de acetato y acetaldehído. En el mosto M2 hubo una menor producción de esteres debido principalmente a la falta de aminoácidos como serina, valina y leucina, por lo que la levadura utiliza todos los nutrientes dirigiéndolos hacia la síntesis de aminoácidos y no hacia su catabolismo.

#### ***D) Formación de esteres. Cepa 820***

- **STR2**

Expresado en malta M1.

Este gen codifica para una cistation gama-sintasa, la cual es una enzima clave en la biosíntesis de metionina (Fu *et al.*, 2013). También se encontró relacionada a la producción de compuestos volátiles de azufre. Este gen fue asociado a genes involucrados en la generación de esteres: URA2, LEU1, BAT1,

BAT2 (genes que participan en la generación de acetato de isoamilo a partir de piruvato y leucina)

- **SDH1**

Expresado en malta M1.

Codifica para la subunidad (flavoproteína) de la succinato deshidrogenasa, la cual participa en la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de TCA (Cherry *et al.*, 2012; Kanehisa *et al.*, 2000).

Mostró asociación con los genes involucrados en la generación de ésteres (LPD1, LAT1 y LEU1), síntesis de pirimidina y arginina (URA2 y ARG4) y genes involucrados en el envejecimiento celular, transporte de protones y detoxificación (PMA1 y BPT1) (Cherry *et al.*, 2012).

- **HIP1**

Expresado en malta M2.

Codifica para la enzima permeasa de histidina que se encarga del transporte del aminoácido histidina y transporte de iones magnesio. La histidina es uno de los aminoácidos que ha sido relacionada a la producción de esteres ya que activa enzimas permeasas específicas permitiendo la disponibilidad para las distintas rutas de producción de compuestos aromáticos (Loviso y Libkind. 2018). Asociación con el gen URA2.

- **ARI1**

Expresado en malta M1.

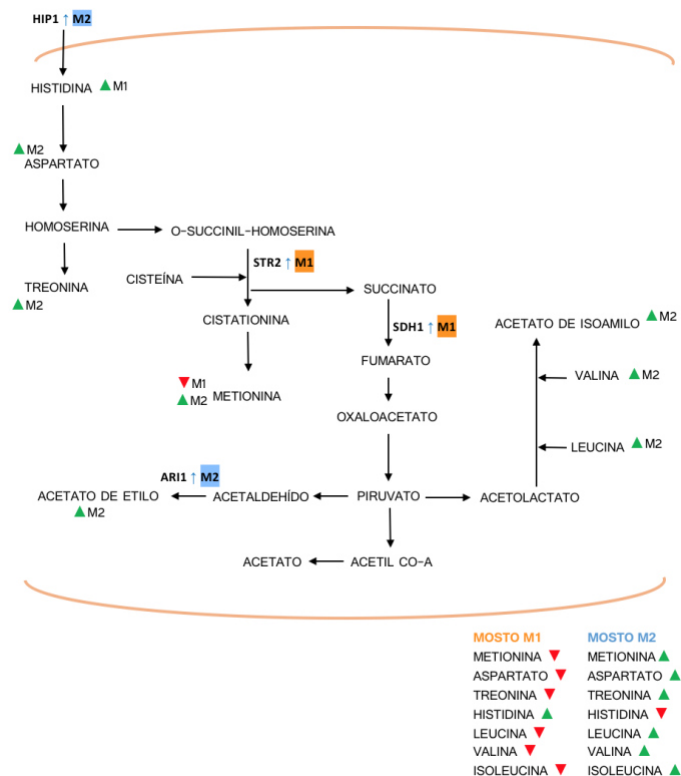
Ya fue descrita anteriormente en la síntesis de compuestos de azufre. Este gen codifica para una reductasa de aldehídos aromáticos y alifáticos a su respectivo alcohol, principales componentes de la síntesis de ésteres. se relaciona con la respuesta de tipo “*quorum sensing*”.

Haciendo un análisis de las rutas metabólicas que impactan la formación de esteres y los genes encontrados, se puede observar que en esta cepa regula la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en procesos anteriores para la formación de piruvato.

Para la producción de esteres en la cepa 820, solo se encontraron cuatro genes asociados a las rutas de producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo con expresión diferencial entre variedades de malta.

En el mosto M1, la cepa sobreexpresa el gen **STR2** para satisfacer la demanda de metionina, el cual se encuentra a baja concentración. Esta sobreexpresión genera un aumento en el nivel de succinato el cual es oxidado a fumarato por el gen **SDH1** para la producción de oxalacetato, importante precursor del piruvato. Al no haber suficiente disponibilidad de los aminoácidos valina y leucina, el piruvato puede ser desviado hacia otra ruta disminuyendo las concentraciones de esteres producidos.

En el mosto M2, la actividad del gen **HIP1** es sobreexpresada para aumentar la entrada del aminoácido histidina al medio, debido tal vez a la baja disponibilidad de este aminoácido. En comparación con el mosto M1, el mosto M2 contiene una mayor cantidad de casi todos los aminoácidos, obteniendo así suficientes precursores para la generación de esteres y al sobreexpresar el gen **ARI1**, la producción de acetato de etilo se ve aumentada (Fig. 28).



**Figura 28.** Formación de esteres. Cepa 820

### III.4 CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias pudimos observar lo siguiente:

- i) Las secuencias codificantes tienen diferente porcentaje de homología con *Saccharomyces cerevisiae*, 60% para la cepa 790 y 45% para la cepa 820.
- ii) La cepa 790 contiene un transcrito expresado en el mosto M1 y es producto de una fusión entre el gen FLO10 y YHR213W, ambos relacionados con floculación, esta fusión no fue encontrada en la cepa 820.
- iii) La cepa 820 tiene una fusión entre los genes TAF4 y PLB1, este último relacionado con el metabolismo de lípidos y fue expresado en el mosto M2.
- iv) El análisis de rutas metabólicas permitió identificar un mayor número de transcritos en la cepa 790 que en la cepa 820.
- v) La producción de compuestos volátiles de azufre está regulada principalmente por los aminoácidos disponibles en el medio, siendo la metionina el aminoácido que más impacta.
- vi) La producción de ésteres es regulada principalmente por la síntesis de piruvato a partir del aminoácido serina y en segundo lugar por la disponibilidad de los aminoácidos valina y leucina.
- vii) La cepa 820 mostró expresión en los genes ARI1 y DMC1/RecA, los cuales están relacionados con la comunicación celular tipo “*quorum sensing*” que regula importantes procesos como floculación, esporulación y meiosis. Esta cepa además tuvo un crecimiento celular más alto que el observado en la cepa 790. Al existir una mayor concentración de etanol, producto de la alta densidad celular y una acelerada disminución de nutrientes en el medio, la cepa 820 dirige los aminoácidos disponibles hacia la síntesis de pirimidinas para aumentar su resistencia al medio tóxico.
- viii) Ambas cepas reaccionan de diferente manera al activar diferentes rutas metabólicas para sintetizar los compuestos necesarios para su funcionamiento con los nutrientes disponibles en el medio.

#### IV. CONCLUSIONES GENERALES

Ambas cepas han sido utilizadas durante muchos años para producir cervezas de tipo lager. Sin embargo, el conocimiento sobre sus características genómicas es reciente. El análisis del transcriptoma nos permitió descubrir importantes características de las cepas para poder explicar el comportamiento tan diferente que tiene cada una al ser utilizadas para producir cerveza.

En estudios anteriores, nuestro enfoque se centraba solo a los genes involucrados en las rutas metabólicas de asimilación de azufre y producción de ésteres. Sin embargo, con el estudio del transcriptoma pudimos ampliar la visión que teníamos sobre la regulación de compuestos volátiles durante la fermentación y pudimos observar que rutas como el metabolismo del piruvato, síntesis de pirimidinas o genes relacionados a glicoproteínas de membrana o transportadores, son los principales protagonistas de la producción de estos compuestos y del metabolismo de la levadura en general.,

Aunque este trabajo se basó principalmente en las características de cada cepa para la regulación de compuestos que afectan el sabor de la cerveza, es necesario hacer un análisis más profundo sobre genes involucrados en el transporte de aminoácidos, síntesis de la pared celular y la vía de glicólisis/gluconeogénesis. También es interesante investigar las señales de tipo “*quorum sensing*” en el proceso de fermentación, lo cual ha sido poco investigado, para obtener información valiosa sobre cómo modular los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la fermentación, tal vez esta sea la clave para poder manipular el desempeño de las fermentaciones y las características de la cerveza.

En cuanto a las características de la malta, las proteínas que encontramos no pudieron ser relacionadas con los genes expresados por la levadura ni por la carga de aminoácidos presentes en los mostos. Sin embargo, con el estudio del proteoma pudimos identificar proteínas que sirven como marcadores de calidad para otros parámetros de calidad de la cerveza. También mediante el estudio con zimogramas, encontramos una enzima con actividad amilolítica la cual no ha sido reportada antes en cebada y estamos en proceso de obtener su identidad.



Actualmente, en nuestro laboratorio se esta haciendo un analisis mas profundo de los sistemas hidroliticos en cada malta para conocer que tipo de actividad enzimatica tiene cada variedad y poder relacionarlo al perfil de aminoacidos de cada mosto.

## REFERENCIAS

- Agudelo-Romero P., Erban A., Sousa L., Salomé PM., Kopka J., Fortes AM. 2013. Search for transcriptional and metabolic markers of grape pre-ripening and ripening and insights into specific aroma development in three portuguese cultivars. Editado por Miguel A. Blazquez. *PLOS ONE*. **8**(4). doi.org/10.1371/journal.pone.0060422.
- Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**(3): 403-410. doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- American Society of Brewing Chemists. 1996. ASBC Methods of analysis. 8th revised edition. St Paul, MN. U.S.A.
- Anderberg RJ., Walker-Simmons MK. 1992. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**(21): 10183-87.
- Anderson RG., Kirsop BH. 1975. Quantitative aspects of the control by oxygenation of acetate ester formation of worts of high specific gravity. *Journal of the Institute of Brewing*. **81**: 296–301.
- Arends AM., Fox GP., Henry RJ., Marschke RJ., Symons MH. 1995. Genetic and environmental variation in the diastatic power of australian barley. *Journal of Cereal Science*. **21**(1): 63-70. doi.org/10.1016/S0733-5210(95)80009-3.
- Avbelj M., Zupan J., Raspor P. 2016. Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**(18): 7841-52. doi.org/10.1007/s00253-016-7758-3.
- Baker EC, Wang B., Bellora N., Peris D., Hulfachor AB., Koshalek JA., Adams M., Libkind D., Hittinger CT. 2015. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Molecular Biology and Evolution*. **32**(11): 2818-31. doi.org/10.1093/molbev/msv168.
- Blasco L., Viñas M., González TV. 2011. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. **14**(2): 61-71.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**(1): 248-54. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Burmeister M., Drummond C., Pfisterer E., Hysert W. 1992. Measurement of volatile sulfur compounds in beer using gas chromatography with a sulfur chemiluminescence detector. *Journal of American Society of Brewing Chemists*. **50**(2): 53-58.
- Cai S., Yu G., Chen X., Huang Y., Jiang X., Zhang G., Jin X. 2013. Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC Plant Biology*. **13**(1): 35. doi.org/10.1186/1471-2229-13-35.
- Chengye M., Yuanyuan H., Yanfei C., Xingda B., Hongjun L. 2016. Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of the Institute of Brewing*. **122**(2): 251-60. doi.org/10.1002/jib.330.

- Cherry J., Eurie ML., Craig AH., Balakrishnan R., Binkley G., Chan ET., Christie ET. 2012. *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast». *Nucleic Acids Research*. **40**(D1): D700-705. doi.org/10.1093/nar/gkr1029.
- Chiung YM., Lin BL., Yeh CH., Lin CY. 2000. Heat shock protein (HSP70)-Related epitopes are common allergenic determinants for barley and corn antigens. *Electrophoresis*. **21**(2): 297-300.
- Colgrave ML., Goswami H., Howitt CA., Tanner GJ. 2013. Proteomics as a tool to understand the complexity of beer». *Food Research International*, **54**(1): 1001-12. doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.043.
- Conesa A., Gotz S. 2008. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*. doi.org/10.1155/2008/619832.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez JM., Terol J., Talon M., Robles M. 2005. Blast2GO: A Universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. **21**(18): 3674-76. doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610.
- Damas-Buenrostro LC., Gracia-González G., Hernández-Luna CE., Galán-Wong LJ. Pereyra-Alfárez B., Sierra-Benavides JA. 2008. Detection of FLO genes in lager and wild yeast strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **66**(3): 184-87. doi.org/10.1094/ASBCJ-2008-0624-01.
- Damas-Buenrostro LC., Pereyra-Alfárez B. 2009. Control genético de la floculación de *Saccharomyces cerevisiae* en proceso de fermentación industrial., *CIENCIA UANL*. **12**(4).
- De León-Medina PM., Elizondo-González R., Damas-Buenrostro LC., Geertman JM., Van den Broek M., Galán-Wong LJ., Ortiz-López R., Pereyra-Alfárez B. 2016. Genome annotation of a *Saccharomyces* sp. Lager brewer's yeast. *Genomics Data*. **9**: 25-29. doi.org/10.1016/j.gdata.2016.05.009.
- Duan W., Roddick FA., Higgins VJ., Rogers PJ. 2004. A parallel analysis of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **62**(1): 35-41. doi.org/10.1094/ASBCJ-62-0035.
- Duc C., Pradal M., Sanchez I., Noble J., Tesnière C., Blondin B. 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLOS ONE*. **12**(9). doi.org/10.1371/journal.pone.0184838.
- Erkkilä MJ., Leah R., Ahokas H., Cameron-Mills V. 1998. Allele-dependent barley grain  $\beta$ -amylase activity. *Plant Physiology*. **117**(2): 679. doi.org/10.1104/pp.117.2.679.
- Eschenbruch R. 1974. Sulfite and sulfide formation during winemaking -- a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **25**(3): 157.
- Ferreira ML., Guido FL. 2018. Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*. **4**(2). doi.org/10.3390/fermentation4020023.
- Fontanini D., Jones BL. 2001. Study of metallopeptidase isozymes from malted barley (*Hordeum vulgare* cv. *morex*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**(10): 4903-11.
- Freese EB., Olempska-Beer Z., Hartig A., Freese E. 1984. Initiation of meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* by sulfur or guanine deprivation. *Developmental Biology*. **102**(2): 438-51. doi.org/10.1016/0012-1606(84)90209-4.
- Fu J., Wu J., Jiang J., Wang Z., Ma Z. 2013. Cystathionine gamma-synthase is essential for methionine biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Biology*. **117**(1): 13-21. doi.org/10.1016/j.funbio.2012.11.001.
- Gibson BR., Lawrence SJ., Leclaire JPR., Powell CD., Smart KA. 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*. **31**(5): 535-69. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x.

- Gomez-Cadenas A., Verhey SD., Holappa LD., Shen Q., Ho TH., Walker-Simmons MK. 1999. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**(4): 1767-72.
- Grudkowska M., Lisik P., Rybka K. 2013. Two-dimensional zymography in detection of proteolytic enzymes in wheat leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. **35**(12): 3477-82. doi.org/10.1007/s11738-013-1371-1.
- Guo B., Luan H., Lin S., Lv C., Zhang X., Xu R. 2016. Comparative proteomic analysis of two barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) with contrasting grain protein content. *Frontiers in Plant Science*. **7**: 542. doi.org/10.3389/fpls.2016.00542.
- Haas BJ., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood PD., Bowden J., Couger MB. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq using the trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. **8**(8): 1494-1512. doi.org/10.1038/nprot.2013.084.
- Hansen J., Kielland-brandt MC. 1996. Inactivation of MET2 in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *Journal of Biotechnology*. **50**(1): 75-87. doi.org/10.1016/0168-1656(96)01551-9.
- Herrera-Gamboa JG., Leal-Guerra CS., Pérez-Ortega E., Damas-Buenrostro LC., Cabada JC., Galán-Wong LJ., Pereyra-Alfárez B. 2015. Regulación de genes que afectan la biosíntesis de compuestos de azufre en cerveza. *CIENCIA UANL*. **17**(67): 52-57.
- Herrera-Gamboa JG., López-Alvarado CB., Pérez-Ortega E., Damas-Buenrostro LC., Cabada-Amaya JC., Pereyra-Alfárez B. 2018. Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare* L.) and their impact on wort quality. *Journal of Cereal Science* **80**: 150-57. doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.004.
- Howell KS, Klein M., Swiegers JH., Hayasaka Y., Elseby GM, Fleet GH., Høj PB., Pretorius IS., Barros-Lopes MA. 2005. Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(9): 5420-26. doi.org/10.1128/AEM.71.9.5420-5426.2005.
- Hu S., Junhong Y., Jianjun D., Evans DE., Liu J., Shuli H., Shuxia H., Wei F., Hua Y., Mei L. 2014. Relationship between levels of diastatic power enzymes and wort sugar production from different barley cultivars during the commercial mashing process of brewing. *Starch - Stärke*. **66**(7-8): 615-23. doi.org/10.1002/star.201300152.
- Huet C., Menendez J., Gancedo C., François JM. 2003. Regulation of PYC1 encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. **267**(23): 6817-23. doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01779.x.
- Ishtar-Snoek IS., Yde SH. 2006. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **24**(1): 1-10. doi.org/10.1002/yea.1430.
- Jarrett SJ., Rj M., Symons MH., Gibson CE., Henry RJ., Fox JP. 1997. Alpha-amylase/subtilisin inhibitor levels in Australian barleys. *Journal of Cereal Science* **25**(3): 261-66. doi.org/10.1006/jcrs.1996.0084.
- Jin B., Lin L., Guo-Qin L., Bing L., Yu-Kui Z., Liao-Ning L. 2009. Structural changes of malt proteins during boiling. *Molecules*. **14**(3): 1081-97. doi.org/10.3390/molecules14031081.
- Jin Y., Speers A., Paulson AT., Stewart RJ. 2004. Effects of  $\beta$ -glucans and environmental factors on the viscosities of wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*. **110**(2): 104-16. doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00189.x.
- Jin Z., Xiao-Min L., Fei G., Jun-Yong S., Yu-Wen M., Jian L. 2013a. Proteomic analysis of differences in barley (*Hordeum vulgare*) malts with distinct filterability by DIGE. *Journal of Proteomics*. **93**: 93-106. doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.038.
- Jin Z., Yu-Wen M., Jun-Yong S., Xiao-Min L., Xian-Li G., Jian L. 2013b. Proteome analysis of metabolic proteins (pI 4–7) in barley (*Hordeum vulgare*) malts and

- initial application in malt quality discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**(2): 402-9. doi.org/10.1021/jf3034418.
- Jitrapakdee S., Adina-Zada A., Besant PG., Surinya KH., Wallace WC., Wallace JC., Attwood PV. 2007. Differential regulation of the yeast isozymes of pyruvate carboxylase and the locus of action of acetyl-CoA. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**(6): 1211-23. doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.016.
- Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Katayama T., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., Yamanishi Y. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. **28**(1): 27-30. doi.org/10.1093/nar/28.1.27.
- Kankipati HN., Rubio-Teixeira M., Castermans D., Diallinas G., Thevelein JM. 2015. SUL1 and SUL2 sulfate transceptors signal to protein kinase A upon exit of sulfur starvation. *The Journal of Biological Chemistry*. **290**(16): 10430-46. doi.org/10.1074/jbc.M114.629022.
- Khan NA., Ruqaiyyah S. 2015. Is there evidence of sexual reproduction (meiosis) in *Acanthamoeba*?. *Pathogens and Global Health*. **109**(4): 193-95. doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000009.
- Krogerus K., Gibson BR. 2013. Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**(15): 6919-30. doi.org/10.1007/s00253-013-4955-1.
- Kruse E., Zhonglai L., Klaus K. 1993. Expression of heat shock proteins during development of barley. *Plant Molecular Biology*. **23**(1): 111-22. doi.org/10.1007/BF00021424.
- Kurkela S., Franck M. 1990. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Molecular Biology*. **15**(1): 137-44.
- Laštovičková M., Bobálová J. 2012. MS based proteomic approaches for analysis of barley malt. *Journal of Cereal Science*. **56**(3): 519-30. doi.org/10.1016/j.jcs.2012.07.013.
- Leal-Guerra CS. 2011. Regulacion de la expresion de genes involucrados en la produccion de compuestos de azufre en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestria. UANL.
- Lekkas C., Stewart GG., Hill A., Taidi B., Hodgson J. 2005. The importance of free amino nitrogen in wort and beer. *Master Brewers Association of the Americas*. **42**(2): 113-16. doi.org/10.1094/TQ-42-0113.
- Li X., Zhao J., Fei G., Jian Lu., Guolin C., Jianjun D., Junhong Y., Mei Y. 2014. Comparative proteomic analysis of Dan'er malts produced from distinct malting processes by two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis (2D-DIGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62**(38): 9310-16. doi.org/10.1021/jf5030483.
- Liaquat M., Apenten RO. 2008. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of Food Science*. **65**(2): 295-99. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15996.x.
- Limure T., Kazuhiro S. 2013. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*. **54**(1): 1013-20. doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.028.
- Liu ZL., Moon J. 2009. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene*. **446**(1): 1-10. doi.org/10.1016/j.gene.2009.06.018.
- López-Malo M., García-Ríos E., Melgar B., Sanchez MR., Dunham MJ., Guillamón JM. 2015. Evolutionary engineering of a wine yeast strain revealed a key role of

- inositol and mannoprotein metabolism during low-temperature fermentation. *BMC Genomics*. **16**(1): 537. doi.org/10.1186/s12864-015-1755-2.
- Loviso CL., Libkind D. 2018. Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006.
- Luarasi L., Troja R., Pinguli L. 2016. The relationship between yeast viability and concentration in the fermentation process of wort for beer production. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*. **3**(1).
- Luttik MA., Kotter P., Salomons FA., van der Klei IJ., van Dijken JP., Pronk JT. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *Journal of Bacteriology*. **182**(24): 7007-13.
- Marchler-Bauer A., Derbyshire MK., Gonzales NR., Lu S., Chitsaz F., Geer LY., Geer RC. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*. **43**(D1): D222-26. doi.org/10.1093/nar/gku1221.
- Marconi O., Sileoni V., Ceccaroni D., Perretti G. 2017. The use of rice in brewing. En *Advances in International Rice Research*. Editado por Jin Quan Li. Rijeka: InTech. doi.org/10.5772/66450.
- Matthies IE., Malosetti M., Röder MS., van Eeuwijk F. 2014 Genome-wide association mapping for kernel and malting quality traits using historical european barley records. *PLOS ONE* **9**(11): e110046. doi:10.1371/journal.pone.0110046
- Meilgaard M. 1999. Wort composition. En J. McCabe (Ed), *The Practical Brewer. Tercera Ed.* p: 147-163. Wauwatosa, WI: Master Brewers Association of the Americas
- Mertens S., Steensels J., Saels V., Rouck GD., Aerts G., Verstrepen KJ. 2015. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. Editado por D. Cullen. *Applied and Environmental Microbiology*. **81**(23): 8202-14. doi.org/10.1128/AEM.02464-15.
- Micheelsen PO., Østergaard PR., Lange L., Skjot M. 2008. High-level expression of the native barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. **133**(4): 424-32. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.11.012.
- Monerawela C., Bond U. 2017. Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. *Biotechnology Advances*. **35**(4): 512-19. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.003.
- Mountain HA., Byström AS., Larsen JT., Korch C. 1991. Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **7**(8): 781-803. doi.org/10.1002/yea.320070804.
- Mountounet M. 1969. Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. *Ann. Technol. Agric.* **18**: 249-261.
- Munck L., Mundy J., Vaag P. 1985. Characterization of enzyme inhibitors in barley and their tentative role in malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **43**(1): 35-38. doi.org/10.1094/ASBCJ-43-0035.
- Munroe JH. 1995. Fermentación. Capítulo 13 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. Editado por: Marcel Dekker Inc. USA. pp. 323.
- Nielsen PK., Bønsager BC., Fukuda K., Svensson B. 2004. Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: Structure, biophysics and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1696**(2): 157-64. doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.09.019.
- Olaniran AO., Hiralal L., Mokoena MP., Pillay B. 2017. Flavour-Active Volatile Compounds in Beer: Production, Regulation and Control. *Journal of the Institute of Brewing*. **123**(1): 13-23. doi.org/10.1002/jib.389.
- O'Rourke T., 2002. Malt specifications & brewing performance. *The BREWER International*, **2**: 27-30.

- Padmakar B., Madhavalatha P., Ramakrishna V. 2005. Purification of alkaline protease from the cotyledons of germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var *lignosus*) seeds. *Biotechnology*. **4**: 365–369. doi.org/10.3923/biotech.2005.365. 369.
- Pais TM., Foulquié-Moreno MR., Hubmann G., Duitama J., Swinnen S., Goovaerts A., Yang Y., Dumortier F., Thevelein JM. 2013. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. *PLOS Genetics*. **9**(6): e1003548. doi.org/10.1371/journal.pgen.1003548.
- Peñalva M. 2011. Research & production trends in Mexico. In: *AMBA Barley Improvement Conference (BIC) & Barley Coordinated Agricultural Project (BCAP) Combined Meeting*. San Diego.
- Pérez-Ortega ER. 2010. Evaluación analítica y sensorial del efecto de variables de proceso (cepa, mosto y viabilidad de levadura) en la generación de compuestos de azufre en la producción de cerveza. Tesis de Maestría. ITESM.
- Perrocheau L., Rogniaux H., Boivin P., Marion D. 2005. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *PROTEOMICS*. **5**(11): 2849-58. doi.org/10.1002/pmic.200401153.
- Pfisterer E., Stewart GG. 1975. Some aspects on the fermentation of high gravity worts. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* **15**:255–267.
- Pittet M., Conzelmann A. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Regulation of Lipid Metabolism in Yeast*. **1771**(3): 405-20. doi.org/10.1016/j.bbali.2006.05.015.
- Poreda A., Czarnik A., Marek Z., Marek J. Piotr A. 2014. Corn grist adjunct – application and influence on the brewing process and beer quality. *Journal of the Institute of Brewing*. **120** (1): 77-81. doi.org/10.1002/jib.115.
- Potokina E., Prasad M., Malysheva L., Röder MS., Graner A. 2006. Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (CXP1), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & Integrative Genomics*. **6**(1): 25-35. doi.org/10.1007/s10142-005-0008-x.
- Pripis-Nicolau L., de Revel G., Bertrand A., Maujean A. 2000. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(9): 3761-66. doi.org/10.1021/jf991024w.
- Pronk JT., Steensma HY., Van Dijken JP. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **12**(16): 1607-33. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4.
- Quintero-Vásquez, GA. 2011. Análisis en la expresión genética en la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en *Saccharomyces cerevisiae*, en distintas condiciones de fermentación en el proceso cervecero. Tesis de Maestría. UANL.
- Rapp A., Mandery H. 1986. Wine aroma. *Experientia*. **42**: 873-884.
- Rezaei MK., Shobbar Z., Shahbazi M., Abedini R., Zare S. 2013. Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. *Journal of Plant Physiology*. **170**(14): 1277-84. doi.org/10.1016/j.jplph.2013.04.005.
- Rossouw D., Bauer FF. 2009. Comparing the transcriptomes of wine yeast strains: toward understanding the interaction between environment and transcriptome during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **84**(5): 937-54. doi.org/10.1007/s00253-009-2204-4.
- Russell I. 1995. Levadura. Capítulo 10. En: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. Editado por: Marcel Dekker Inc. USA. p.169
- Sablayrolles JM., Ball CB. 1995. Fermentation kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation. *J. Am. Soc. Brew Chem.* **53**:71–78.

- Salcedo E., Sims PFG., Hyde JE. 2005. A glycine-cleavage complex as part of the folate one-carbon metabolism of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*. **21**(9): 406-11. doi.org/10.1016/j.pt.2005.07.001.
- Salgado-Albarrán M., Herrera-Díaz, J., Dinkova TD. 2015. Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP*. **18**(1): 43-51. doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.004.
- Schmitt MR., Marinac L. 2008. Beta-amylase degradation by serine endoproteinases from green barley malt. *Journal of Cereal Science*. **47**(3): 480-88. doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.002.
- Schmitt MR., Skadsen RW., Budde AD. 2013. Protein mobilization and malting-specific proteinase expression during barley germination. *Journal of Cereal Science*. **58**(2): 324-32. doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.007.
- Secades P., Guijarro JA. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 3969-75.
- Shinohara A., Gasior S., Ogawa T., Kleckner N., Bishop DK. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* RecA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. *Genes to Cells*. **2**(10): 615-29. doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1480347.x.
- Sigmund E. 1970. Wort composition and beer flavour. The influence of some amino acids on the formation of higher aliphatic alcohols and esters. *Journal of the Institute of Brewing*. **76**(3): 254-61. doi.org/10.1002/j.2050-0416.1970.tb03292.x.
- Specker C., Ludwig N., Rudi FV. 2014. *In vitro* studies on the main beer protein Z4 of *Hordeum vulgare* concerning heat stability, protease inhibition and gushing. *Journal of the Institute of Brewing*. **120**(2): 85-92. doi.org/10.1002/jib.118.
- Statistica. 2014. Beer production worldwide from 1998 to 2014 (in billions of hectoliters). *Statistica*. New York. NY.
- Steiner E., Gastl M., Becker T. 2011. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: A review. *European Food Research and Technology*. **232**(2): 191-204. doi.org/10.1007/s00217-010-1412-6.
- Sun Z., Henson CA. 1990. Degradation of native starch granules by barley  $\alpha$ -glucosidases. *Plant Physiology*. **94**(1): 320-27.
- Szklarczyk D., Morris JH., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*. **45**(D1): D362-68. doi.org/10.1093/nar/gkw937.
- The UniProt Consortium. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*. **43**(D1): D204-12. doi.org/10.1093/nar/gku989.
- Thurston PA., Taylor R., Avhenainen J. 1981. Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *Journal of the Institute of Brewing*. **87**:92-95.
- Thurston PA., Quain DE., Tubb RS. 1982. Lipid metabolism and the regulation of volatile synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*. **88**:90-94.
- Tominaga T., Blanchard L., Darriet P., Dubourdieu D. 2000. A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(5): 1799-1802. doi.org/10.1021/jf990660r.
- Trevisson E., Burlina A., Doimo M., Pertegato V., Casarin A., Cesaro L., Navas P., Basso G., Sartori G., Salviati L. 2009. Functional complementation in yeast allows molecular characterization of missense argininosuccinate lyase mutations».



- Journal of Biological Chemistry.* **284**(42): 28926-34. doi.org/10.1074/jbc.M109.050195.
- Uno-Okamura K., Kouichi S., Kazuyuki W., Seiichiro K., Takayuki H. 2004. Purification and properties of apoplastic amylase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum.* **121**(1): 117-23. doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00298.x.
- Vandooren J., Geurts N., Martens E., Van den Steen PE., Opdenakker G.. 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods.* **10**(3): 211-20. doi.org/10.1038/nmeth.2371.
- Verstrepen KJ., Derdelinckx G., Dufour JP., Winderickx J., Thevelein JM., Pretorius IS., Delvaux FR. 2003. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **96**(2): 110-18. doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5.
- Vincenzi S., Bierma J., Wickramasekara SI., Curioni A., Gazzola D., Bakalinsky AT. 2014. Characterization of a grape class IV chitinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **62**(24): 5660-68. doi.org/10.1021/jf501225g.
- Walther A., Hesselbart A., Wendland J. 2014. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3: Genes/Genomes/Genetics.* **4**(5): 783-93. doi.org/10.1534/g3.113.010090.
- Wrobel R., Jones BL. 1993. Identification and partial characterization of high Mr neutral proteinases from 4-day germinated barley seed. *Journal of Cereal Science.* **18**(3): 225-37. doi.org/10.1006/jcrs.1993.1049.
- Wrobel R., Jones BL. 1992. Electrophoretic study of substrate and pH dependence of endoproteolytic enzymes in green malt. *Journal of the Institute of Brewing.* **98**(6): 471-78. doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01132.x.
- Ye J., Fang L., Zheng H., Zhang Y., Chen J., Zhang Z., Wang J. 2006. WEGO: A Web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research.* **34**(Web Server): W293-97. doi.org/10.1093/nar/gkl031.
- Ye L., Huang L., Huang Y., Wu D., Hu H., Li C., Zhang G. 2014. Haze activity of different barley trypsin inhibitors of the chloroform/methanol type (BTI-CMe). *Food Chemistry.* **165**: 175-80. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.058.
- Ye L., Huang Y., Li M., Li C., Zhang G. 2016. The chemical components in malt associated with haze formation in beer: Chemical components in malt. *Journal of the Institute of Brewing.* **122**(3): 524-29. doi.org/10.1002/jib.353.
- Yennawar NH., Li LC., Dudzinski DM., Tabuchi A., Cosgrove DJ. 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m1*), a  $\beta$ -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **103**(40): 14664. doi.org/10.1073/pnas.0605979103.
- Yin H., Dong JJ., Yu JH., Zhong C., Liu LP., Liu M., Yang PF., Hao JG., Jia SR. 2017. Intracellular metabolite profiling of industrial yeast and the synthesis of flavour compounds in beer: Metabolic analysis of flavor during beer fermentation». *Journal of the Institute of Brewing.* **123**(3): 328-36. doi.org/10.1002/jib.436.
- Younis OS., Stewart GG. 1998. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing.* **104**:255-264.
- Zhang N., Jones BL. 1995. Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Cereal Science.* **21** (2): 145-53. doi.org/10.1016/0733-5210(95)90030-6.
- Zhang W., Kaneko T., Takeda K. 2004.  $\beta$ -amylase variation in wild barley accessions. *Breeding Science.* **54**(1): 41-49. doi.org/10.1270/jsbbs.54.41.

## APENDICE A.

### NOMBRE DE LAS SECUENCIAS DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS PARA CADA CEPA Y SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.

**Tabla 19.** Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 790 con una significancia de  $p=0.001$

comp5423_c1_seq20	comp4156_c0_seq3	comp4087_c0_seq5	comp5207_c0_seq2
comp5592_c4_seq3	comp4497_c0_seq2	comp5598_c1_seq2	comp5423_c1_seq21
comp5592_c4_seq7	comp4227_c0_seq3	comp5450_c0_seq8	comp7332_c1_seq1
comp4909_c0_seq1	comp5144_c0_seq2	comp2679_c0_seq1	comp4497_c0_seq1
comp5449_c0_seq4	comp5535_c1_seq2	comp5406_c0_seq5	comp5459_c0_seq5
comp5386_c0_seq2	comp3741_c0_seq2	comp5205_c0_seq1	comp4087_c0_seq3
comp5588_c0_seq3	comp4233_c0_seq1	comp2938_c0_seq1	comp5008_c0_seq2
comp5446_c0_seq18	comp4156_c0_seq2	comp4202_c0_seq2	comp5456_c1_seq4
comp4864_c0_seq2	comp5423_c1_seq15	comp5501_c0_seq5	

**Tabla 20.** Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 790 con una significancia de  $p=0.05$

comp4496_c0_seq2	comp5498_c0_seq9	comp4156_c0_seq2	comp5037_c0_seq1	comp4087_c0_seq3
comp2552_c0_seq1	comp4182_c0_seq2	comp5144_c0_seq4	comp4048_c1_seq1	comp3654_c0_seq2
comp5592_c4_seq3	comp4202_c0_seq2	comp5423_c1_seq9	comp4864_c0_seq2	comp5008_c0_seq2
comp5592_c4_seq7	comp5501_c0_seq5	comp1755_c0_seq2	comp4967_c0_seq1	comp5456_c1_seq4
comp4909_c0_seq1	comp4622_c0_seq2	comp5423_c1_seq15	comp5498_c0_seq1	comp3822_c0_seq1
comp5449_c0_seq4	comp4896_c0_seq4	comp4087_c0_seq5	comp5598_c1_seq1	comp5423_c1_seq20
comp5588_c0_seq3	comp5309_c0_seq7	comp2679_c0_seq1	comp4494_c0_seq2	comp5386_c0_seq2
comp5501_c0_seq3	comp7332_c1_seq1	comp5450_c0_seq8	comp5535_c1_seq2	comp5254_c0_seq3
comp4978_c0_seq1	comp4497_c0_seq1	comp5406_c0_seq5	comp3522_c0_seq1	comp5406_c0_seq4
comp4156_c0_seq3	comp5525_c0_seq6	comp5309_c0_seq5	comp4233_c0_seq1	comp5446_c0_seq18
comp5205_c0_seq1	comp4497_c0_seq2	comp2122_c0_seq1	comp3233_c0_seq2	
comp2938_c0_seq1	comp4227_c0_seq3	comp5506_c0_seq6	comp3741_c0_seq2	
comp3625_c0_seq2	comp5144_c0_seq2	comp5423_c1_seq21	comp5598_c1_seq2	
comp3826_c0_seq2	comp4048_c0_seq1	comp5459_c0_seq5	comp4986_c0_seq1	
comp5207_c0_seq2	comp5423_c1_seq5	comp5006_c0_seq3	comp5344_c0_seq9	

**Tabla 21.** Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 820 con una significancia de  $p=0.001$

comp5744_c0_seq3	comp5738_c0_seq10	comp5701_c0_seq4	comp4585_c0_seq2	comp5744_c0_seq2
comp5314_c0_seq2	comp5672_c0_seq4	comp5464_c0_seq5	comp1788_c0_seq2	comp5422_c0_seq1
comp4711_c0_seq2	comp5757_c0_seq6	comp2105_c0_seq2	comp3320_c0_seq3	comp5233_c0_seq1
comp4585_c0_seq1	comp5701_c0_seq5	comp4901_c0_seq1	comp5619_c1_seq3	

**Tabla 22.** Nombre de las secuencias de transcritos diferencialmente expresados en la cepa 820 con una significancia de  $p=0.05$

comp4711_c0_seq2	comp5504_c2_seq7	comp5686_c0_seq16	comp5757_c0_seq6	comp993_c0_seq2
comp4833_c0_seq2	comp5504_c0_seq6	comp2105_c0_seq2	comp4711_c0_seq3	comp4490_c0_seq5
comp5656_c0_seq3	comp993_c0_seq1	comp3070_c0_seq1	comp1788_c0_seq2	comp5744_c0_seq2
comp2233_c0_seq1	comp5540_c1_seq1	comp5275_c0_seq2	comp5463_c0_seq3	comp3320_c0_seq3
comp4178_c0_seq1	comp5619_c1_seq4	comp4901_c0_seq1	comp5701_c0_seq4	comp5738_c0_seq10
comp5090_c0_seq2	comp5053_c0_seq2	comp5551_c0_seq2	comp5464_c0_seq5	comp5672_c0_seq4
comp5741_c2_seq22	comp4847_c0_seq1	comp4980_c0_seq1	comp4246_c0_seq1	comp5233_c0_seq1
comp5701_c0_seq5	comp5422_c0_seq1	comp5741_c2_seq37	comp5597_c0_seq3	comp4585_c0_seq2
comp5619_c1_seq3	comp5394_c0_seq1	comp4585_c0_seq1	comp4801_c0_seq2	comp3884_c0_seq2
comp5744_c0_seq3	comp5314_c0_seq2			

## APENDICE B.

### NIVELES DE EXPRESION DE TRANSCRITOS CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.

**Tabla 23.** Niveles de expresion de DGEs. Cepa 790 p=0.05

SECUENCIA	M1_RSEM	M2_RSEM	SECUENCIA	M1_RSEM	M2_RSEM
comp4496_c0_seq2	2.63	27.59	comp5423_c1_seq20	7.32	0.02
comp2552_c0_seq1	0.05	5.66	comp5386_c0_seq2	12.54	0.07
comp5592_c4_seq3	0.7	25.71	comp5254_c0_seq3	0.01	11.14
comp4909_c0_seq1	0.01	5.7	comp5406_c0_seq4	6.3	0.02
comp5449_c0_seq4	0.01	8.46	comp5446_c0_seq18	0.07	22.85
comp5588_c0_seq3	0.01	4.89	comp4048_c1_seq1	9.59	0.03
comp5501_c0_seq3	0.09	4.37	comp4864_c0_seq2	14.52	0.1
comp4978_c0_seq1	0.01	5.19	comp4967_c0_seq1	8.97	0.3
comp4156_c0_seq3	0.2	10.92	comp5498_c0_seq1	30.32	1.2
comp4497_c0_seq2	21.56	0.02	comp4494_c0_seq2	5	0.05
comp4227_c0_seq3	0.05	16.2	comp5535_c1_seq2	0.01	18.13
comp5144_c0_seq2	15.45	0.04	comp3522_c0_seq1	7.38	0.02
comp4048_c0_seq1	0.04	13.61	comp4233_c0_seq1	0.01	9.61
comp5423_c1_seq5	60.8	9.11	comp4156_c0_seq2	12.69	0.01
comp3233_c0_seq2	0.01	4.08	comp5144_c0_seq4	0.04	5.92
comp3741_c0_seq2	0.01	15.1	comp5423_c1_seq9	6.68	0.01
comp5598_c1_seq2	0.02	8.87	comp1755_c0_seq2	15.78	0.04
comp4986_c0_seq1	0.02	2.93	comp5423_c1_seq15	0.01	5.12
comp5344_c0_seq9	2.29	25.42	comp4087_c0_seq5	6.64	0.01
comp5205_c0_seq1	20.18	0.02	comp2679_c0_seq1	11.6	0.4
comp2938_c0_seq1	15.66	0.03	comp5450_c0_seq8	0.01	7.49
comp3625_c0_seq2	16.66	0.04	comp5406_c0_seq5	0.02	16.36
comp3826_c0_seq2	0.06	6.92	comp5309_c0_seq5	0.03	4.22
comp5207_c0_seq2	0.002	5.1	comp5498_c0_seq9	0.02	22.78
comp2122_c0_seq1	0.03	10.49	comp4182_c0_seq2	4.17	0.09
comp5506_c0_seq6	0.09	3.72	comp4202_c0_seq2	0.03	7.33
comp5423_c1_seq21	0.02	34.23	comp5501_c0_seq5	5.76	0.08
comp5459_c0_seq5	0.03	4.64	comp4622_c0_seq2	13.58	0.3
comp5006_c0_seq3	0.01	11.23	comp4896_c0_seq4	9.58	0.07
comp4087_c0_seq3	0.01	6.81	comp5309_c0_seq7	0.1	2.67
comp3654_c0_seq2	15.25	0.45	comp7332_c1_seq1	69.43	0.08
comp5008_c0_seq2	0.07	5.14	comp4497_c0_seq1	0.03	22.12
comp5456_c1_seq4	0.9	61.87	comp5525_c0_seq6	0.01	1.93
comp3822_c0_seq1	0.01	3.24			

**Tabla 24.** Niveles de expresion de DGEs. Cepa 820 p=0.05

SECUENCIA	M1_RSEM	M2_RSEM	SECUENCIA	M1_RSEM	M2_RSEM
comp4711_c0_seq2	0.2	18.4	comp3884_c0_seq2	6.04	0.05
comp4833_c0_seq2	0.01	3.75	comp993_c0_seq2	7.3	0.03
comp5656_c0_seq3	0.01	3.53	comp4490_c0_seq5	5.8	0.2
comp2233_c0_seq1	9.83	0.09	comp5744_c0_seq2	7.68	0.01
comp4178_c0_seq1	2.98	0.01	comp3320_c0_seq3	0.85	12.37
comp5090_c0_seq2	0.03	3.89	comp5738_c0_seq10	0.05	5.18
comp5741_c2_seq22	0.05	6.27	comp5672_c0_seq4	16.99	0.09
comp5701_c0_seq5	30.58	0.1	comp5757_c0_seq6	0.6	111.15
comp4847_c0_seq1	0.01	2.57	comp4711_c0_seq3	19.85	2.84
comp5422_c0_seq1	7.49	0.08	comp1788_c0_seq2	3.22	0.01
comp4980_c0_seq1	0.02	6.41	comp5463_c0_seq3	4.62	0.02
comp5741_c2_seq37	2.65	0.3	comp5701_c0_seq4	0.3	27.74
comp4246_c0_seq1	0.02	2.68	comp5464_c0_seq5	0.001	5.57
comp5597_c0_seq3	0.01	3.9	comp5686_c0_seq16	1.05	17.09
comp5233_c0_seq1	0.01	3.41	comp2105_c0_seq2	0.02	5.45
comp4585_c0_seq2	14.54	0.02	comp3070_c0_seq1	0.03	4.84
comp4801_c0_seq2	5.29	0.7	comp5275_c0_seq2	0.09	4.58
comp5619_c1_seq3	0.05	35.42	comp4901_c0_seq1	0.02	12.13
comp5744_c0_seq3	0.06	7.98	comp5551_c0_seq2	0.01	3.77
comp5394_c0_seq1	3.73	0.02	comp5504_c2_seq7	7.48	0.08
comp5314_c0_seq2	8.99	0.11	comp5504_c0_seq6	0.05	7.99
comp4585_c0_seq1	0.07	13.63	comp993_c0_seq1	0.08	8.73
comp5619_c1_seq4	12.16	0.7	comp5540_c1_seq1	0.04	2.65
comp5053_c0_seq2	0.03	2.69			

## RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Jessica Giselle Herrera Gamboa

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: “ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DE *Saccharomyces sp.*  
RELACIONADO CON EL PROTEOMA DE LA MALTA”

Campo de Estudio: Biotecnología aplicada a la Industria.

Datos Personales: Nacida en Durango, Dgo. el 29 de mayo de 1983, hija de Jaime Herrera Ochoa y Ma. Elva Gamboa Herrera.

Educación Superior: Egresada del Instituto Tecnológico de Durango con el grado de Ingeniero Químico en 2008 y con el grado de Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica en 2010.

Experiencia profesional: Profesor titular de la materia de Diagnóstico Molecular I en el programa de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey desde 2018. Especialista en Investigación del grupo de Bioinformática y Dispositivos Médicos de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey desde 2013. Participación como instructora en diversos cursos teórico-prácticos en técnicas de biología molecular, secuenciación y proteómica.